

Modulation der gewebespezifischen Migration von CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biochemikerin Katrin Neumann

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan: der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Andreas Herrman

Gutachter: 1. Prof. Dr. Alf Hamann
 2. PD Dr. Katja Klugewitz
 3. PD Dr. Uta Höpken

eingereicht: 12.01.2012

Datum der Promotion: 18.07.2012

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 <i>Angeborene und adaptive Immunität</i>	1
1.1.2 <i>Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen</i>	2
1.1.3 <i>Die Leber als immunologisches Organ</i>	4
1.2 Die gewebespezifische Migration von T-Zellen	7
1.2.1 <i>Multi-Step-Modell der transendothelialen Migration</i>	7
1.2.2 <i>Regulation der gewebespezifischen Migration</i>	10
1.2.3 <i>Chemokine und ihre Funktion bei der T-Zellmigration</i>	11
1.2.4 <i>Das Lebersinusendothel - ein Sonderfall</i>	12
2 Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Versuchstiere	16
3.2 Reagenzien und Kits	17
3.2.1 <i>Reagenzien</i>	17
3.2.2 <i>Kits</i>	20
3.3 Materialien und Geräte	20
3.3.1 <i>Materialien</i>	20
3.3.2 <i>Geräte</i>	21
3.4 Primer	22
3.5 Antikörper	23

3.6	Medien und Puffer.....	26
3.7	Isolation und Differenzierung definierter Zellpopulationen.....	27
3.7.1	<i>Prinzip der Magnet- und Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung.....</i>	<i>27</i>
3.7.2	<i>Isolation von nicht-parenchymatischen Zellen der Leber und Lebersinusendothelzellen (LSEC).....</i>	<i>28</i>
3.7.3	<i>Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten</i>	<i>30</i>
3.7.4	<i>Isolation antigenpräsentierender Zellen aus Milz, mesenterialen oder peripheren Lymphknoten.....</i>	<i>32</i>
3.7.5	<i>In-vitro-Aktivierung von LSEC.....</i>	<i>33</i>
3.7.6	<i>In-vitro-Differenzierung antigenspezifischer oder polyklonaler T-Helferzellen.....</i>	<i>33</i>
3.7.7	<i>In-vitro-Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch verschiedene Populationen antigenpräsentierender Zellen.....</i>	<i>34</i>
3.7.8	<i>In-vitro-Restimulierung von aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch verschiedene Populationen antigenpräsentierender Zellen.....</i>	<i>35</i>
3.8	Durchflusszytometrie	36
3.8.1	<i>Analyse von Zellpopulationen</i>	<i>36</i>
3.8.2	<i>Nachweis von Oberflächenmolekülen.....</i>	<i>37</i>
3.8.3	<i>Nachweis von intrazellulärem Interferon-γ.....</i>	<i>37</i>
3.8.4	<i>Analyse der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen</i>	<i>38</i>
3.8.5	<i>Analyse der Internalisierung von Chemokinen in LSEC</i>	<i>39</i>
3.8.6	<i>Analyse der enzymatischen Aktivität von Retinaldehydrogenasen.....</i>	<i>39</i>
3.9	Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene	40
3.9.1	<i>Reverse Transkription und Standard-Polymerasekettenreaktion.....</i>	<i>40</i>
3.9.2	<i>Quantitative TaqMan[®]-Polymerasekettenreaktion</i>	<i>41</i>

3.9.3	<i>Western Blot</i>	45
3.10	Analyse von T-Zellfunktionen.....	46
3.10.1	<i>Adhäsion</i>	46
3.10.2	<i>Transmigration</i>	47
3.10.3	<i>In-vivo-Migration von CD4⁺ T-Zellen</i>	50
3.11	Mikroskopie.....	51
3.11.1	<i>Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie</i>	51
3.11.2	<i>In-situ-Nachweis von T-Zellen im Lebergewebe der Maus</i>	52
3.11.3	<i>In-situ-Nachweis von CXCL9 im Lebergewebe der Maus</i>	53
3.12	Maus- und Krankheitsmodelle	53
3.12.1	<i>Generierung von Knochenmarkchimären der Maus</i>	53
3.12.2	<i>Concanavalin A-induzierte Autoimmunhepatitis</i>	56
3.13	Statistische Datenanalyse.....	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Rekrutierung von antigenspezifischen CD4 ⁺ T-Zellen in das Lebergewebe mittels Antigenpräsentation durch LSEC	58
4.1.1	<i>Adhäsion und Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC-Monolayer unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen</i>	58
4.1.2	<i>Antigenabhängige Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in die Leber</i>	61
4.2	Induktion eines Darm-Homingphänotyps bei CD4 ⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel.....	65
4.2.1	<i>Organspezifische Migration von LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen</i>	65
4.2.2	<i>Expression darmspezifischer Homingrezeptoren auf T_{LSEC}</i>	66
4.2.3	<i>Stabilität der Expression von Homingrezeptoren auf T_{LSEC}</i>	69

4.2.4	<i>Einfluss der Retinolsäure auf die Induktion eines Darm-Homingphänotyps bei T_{LSEC}</i>	71
4.2.5	<i>Induktion eines Darm-Homingphänotyps bei Th1-Zellen durch LSEC</i>	75
4.2.6	<i>Expression funktioneller RALDH in LSEC</i>	76
4.3	Chemokinabhängige Rekrutierung von $CD4^+$ T-Zellen durch das Lebersinusendothel.....	80
4.3.1	<i>Endotheliale Chemokinaufnahme und die Rolle von Chemokinrezeptoren bei der Internalisierung von Chemokinen durch LSEC</i>	81
4.3.2	<i>Caveolae- und Clathrin-vermittelte Chemokinbereitstellung durch LSEC</i>	85
4.3.3	<i>Immobilisierung von Chemokinen durch LSEC</i>	90
4.4	Chemokinbereitstellung durch das Lebersinusendothel als therapeutisches Target in einer Autoimmunhepatitis	91
4.4.1	<i>Expression inflammatorischer Chemokine in der Leber während einer Con A-induzierten Autoimmunhepatitis (AIH)</i>	92
4.4.2	<i>Verlauf einer Con A-induzierten AIH nach Gabe von CPZ</i>	94
4.4.3	<i>T-Zellaktivierung und Akkumulation $CXCR3^+$ $CD4^+$ T-Zellen in der Leber während einer Con A-induzierten AIH und nach Gabe von CPZ</i>	98
4.4.4	<i>Einfluss von CPZ auf die Migration von $CD4^+$ T-Zellen unter homöostatischen oder inflammatorischen Bedingungen in die Leber</i>	101
5	Diskussion	103
5.1	Einfluss des Lebersinusendothels auf die antigenabhängige Rekrutierung von $CD4^+$ T-Zellen in das Lebergewebe	103
5.2	Einfluss des Lebersinusendothels auf die Induktion eines Darm-Homingphänotyps bei $CD4^+$ T-Zellen.....	109

5.3	Einfluss des Lebersinusendothels auf die chemokinabhängige Migration von CD4 ⁺ T-Zellen in das Lebergewebe	116
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	124
Literatur	129
Danksagung	149
Anhang	150
Eidesstattliche Erklärung	152

Zusammenfassung

Die gewebespezifische Rekrutierung von Lymphozyten ist ein hoch regulierter Prozess, der von zentraler Bedeutung für die Immunabwehr und Immunüberwachung, aber auch für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist. Die Einwanderung von T-Zellen in ein Gewebe wird durch selektive Wechselwirkungen mit vaskulären Endothelzellen kontrolliert. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe funktioneller Assays *in vitro* und *in vivo* der Frage nachgegangen, ob Interaktionen zwischen Lebersinusendothelzellen (LSEC) und CD4⁺ T-Zellen die gewebespezifische Migration von CD4⁺ T-Zellen beeinflussen und damit Relevanz für den Verlauf spezifischer Immunantworten haben.

Die Präsentation von Antigenen durch zytokinaktivierte LSEC-*Monolayer* führte zu einer erhöhten Adhäsion und Transmigration antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen. Die Daten deuten auf eine Rolle des Lebersinusendothels bei der entzündungsinduzierten, antigenabhängigen Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in das Lebergewebe hin.

In *in-vitro*-Kokultur-Systemen induzierte eine antigenabhängige Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC sowie deren Bereitstellung von Retinolsäure die Expression der darmspezifischen *Homing*rezeptoren $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 auf CD4⁺ T-Zellen. LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen migrierten *in vivo* in das darmassoziierte lymphatische Gewebe und das Darmgewebe von C57BL/6-Mäusen. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass LSEC einen darmspezifischen *Homing*phänotyp und damit die Migration von in der Leber aktivierten CD4⁺ T-Zellen in den Darm induzieren.

Die Bereitstellung von Chemokinen durch LSEC-*Monolayer* mittels Transzytose und Immobilisierung verstärkte die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch das Endothel. Die Gabe eines Inhibitors der endothelialen Chemokintranszytose während einer Concanavalin A-induzierten Autoimmunhepatitis suppressierte den Verlauf der Hepatitis und führte zu einer verminderten Migration von aktivierten CD4⁺ T-Zellen in das

Lebergewebe. Diese Daten weisen dem Lebersinusendothel eine aktive Beteiligung in der chemokinabhängigen Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in die Leber zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Modulation der gewebespezifischen Migration von CD4⁺ T-Zellen über Antigenpräsentation und Chemokinbereitstellung durch das Lebersinusendothel gezeigt und damit weitere spezifische Aspekte in der Funktion der Leber als immunologisches Organ beschrieben.

Schlagwörter: gewebespezifische Migration, Lebersinusendothel, CD4⁺ T-Zellen, endotheliale Antigenpräsentation und Chemokinbereitstellung

Summary

The tissue-specific recruitment of lymphocytes is a strictly regulated process that is of central importance for the immune defence and immune surveillance but also for the pathogenesis of autoimmune diseases. T-cell immigration into a tissue is controlled by selective interactions with vascular endothelial cells. By using functional assays *in vitro* and *in vivo*, the present study addressed the question if interactions between liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) and CD4⁺ T cells influence the tissue-specific migration of CD4⁺ T cells and thus have relevance for the course of specific immune responses.

Antigen presentation by cytokine-activated monolayers of LSEC increased adhesion and transmigration of antigen-specific CD4⁺ T cells. These results indicate an involvement of LSEC in the inflammation-induced, antigen-specific migration of CD4⁺ T cells into the liver tissue.

Antigen-specific activation of naive CD4⁺ T cells by LSEC and their supply of retinoic acid induced expression of the gut-specific homing receptors $\alpha_4\beta_7$ integrin and CCR9 on CD4⁺ T cells in *in-vitro*-culture systems. LSEC-activated CD4⁺ T cells migrated *in vivo* into the gut-associated lymphoid tissue and the intestine of C57BL/6 mice. The findings presented here imply that LSEC induce a gut-specific homing phenotype resulting in migration of liver-activated CD4⁺ T cells into the intestine.

The active supply of chemokines by LSEC via transcytosis and immobilization enhanced transmigration of CD4⁺ T cells. Administration of an inhibitor of the endothelial chemokine transcytosis during Concanavalin A-induced autoimmune hepatitis suppressed hepatitis and resulted in reduced migration of activated CD4⁺ T cells into the liver tissue. The data show the impact of LSEC on the chemokine-dependent recruitment of CD4⁺ T cells into the liver.

In the present study the modulation of the tissue-specific migration of CD4⁺ T cells by LSEC via antigen presentation and supply of chemokines was demonstrated. Thus, additional functional aspects concerning the immunologic functions of the liver were described.

Keywords: tissue-specific migration, liver sinusoidal endothelial cells, CD4⁺ T cells, endothelial antigen presentation and supply of chemokines

Abkürzungsverzeichnis

AIH	Autoimmunhepatitis
ALT	Alanin-Transaminase
APC	antigenpräsentierende Zellen
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CCL	CC Chemokinligand
CCR	CC Chemokinrezeptor
cDMEM	Komplett-DMEM
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CFSE	5-,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
Con A	Concanavalin A
CPZ	Chlorpromazin
cRPMI	Komplett-RPMI
CXCL	CX Chemokinligand
CXCR	CX Chemokinrezeptor
Cy5	Indodicarbocyanin
DAPI	Diamidinophenylindol
DC	dendritische Zellen
DEAB	4-Diethylaminobenzaldehyd
DMEM	Dulbesso's Modified Eagle Medium
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
E-Lig	E-Selektin-Ligand
E-Selektin	Endothel-Selektin
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward light scatter</i>
GAG	Glykosaminoglykane
GALT-DC	dendritische Zellen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GFI	geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität
h	Stunde
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HEV	<i>high endothelial venules</i>
HPF	<i>high power field</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LFA-1	<i>lymphocyte function associated antigen-1</i>
LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>
L-Selektin	Leukozyten-Selektin
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MAdCAM-1	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MHC-I, MHC-II	MHC-Klasse I, MHC-Klasse II
mLN	mesenteriale Lymphknoten
mLN-DC	dendritische Zellen der mesenterialen Lymphknoten
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
NK	natürliche Killer
NPC	nicht-parenchymatische Zellen
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered salt solution
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	R-phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
P-Lig	P-Selektin-Ligand
pLN	periphere Lymphknoten
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

PP	Peyersche Plaques
P-Selektin	Thrombozyten- und Endothel-Selektin
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RALDH	Retinal-Dehydrogenase
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SAPC	<i>spleen-derived antigen presenting cells</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SSC	<i>sideward light scatter</i>
TCR	T-Zellrezeptor
TF-OVA	Transferrin-Ovalbumin
Th1	T Helferzellen 1
T _{LSEC}	LSEC-aktivierte CD4 ⁺ T-Zellen
T _{mLN-DC}	mLN-DC-aktivierte CD4 ⁺ T-Zellen
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
T _{SAPC}	SAPC-aktivierte CD4 ⁺ T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VAP-1	<i>vascular adhesion protein-1</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
Vit A ⁻	Vitamin A-defizient
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
wRPMI	Wasch-RPMI
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Darstellung des immunologisch wichtigen Bereichs der Leber	6
Abb. 2. Multi-Step-Modell der transendothelialen Migration von T-Zellen	9
Abb. 3. Reinheit der verwendeten LSEC.	30
Abb. 4. Titrationskurve eines CXCL9-Standards bei der TaqMan®- <i>real-time</i> -PCR.	44
Abb. 5. Bestimmung der Zellzahl am Durchflusszytometer mittels Fluorescent™ Microspheres.	49
Abb. 6. Generierung von Knochenmarkchimären.....	54
Abb. 7. Anteil MHC-II ⁺ Zellen in den verschiedenen Knochenmarkchimären.....	55
Abb. 8. ALT-Aktivitäten im Plasma von C57BL/6-Mäusen nach i.v. Gabe von Con A.	57
Abb. 9. Phänotypanalyse zytokinaktivierter und nicht-aktivierter LSEC sowie aktivierungs- und antigenabhängige Adhäsion und Transmigration von CD4 ⁺ T-Zellen.	60
Abb. 10. Migration von OVA-spezifischen naiven CD4 ⁺ T-Zellen oder Th1-Zellen bei ubiquitärer Antigenpräsentation nach einmaliger i.v. Gabe des Antigens.	62
Abb. 11. Migration von antigenspezifischen Th1-Zellen bei einer auf das Lebersinusendothel beschränkten Antigenpräsentation nach einmaliger i.v. Gabe des Antigens.....	64
Abb. 12. Proliferation und organspezifische Migration von LSEC-aktivierten CD4 ⁺ T- Zellen.....	66
Abb. 13. Expression gewebespezifischer <i>Homing</i> rezeptoren.	68
Abb. 14. Stabilität des Phänotyps von T _{LSEC} nach Reaktivierung durch SAPC.	70
Abb. 15. Expression von darm- und hautspezifischen <i>Homing</i> rezeptoren auf T _{LSEC} in Abhängigkeit vom Retinolsäure- <i>Signaling</i>	72

Abb. 16. Chemotaxis der T _{LSEC} gegenüber CCL25 und Migration von T _{LSEC} in bestimmte Bereiche des Darms und GALT in Abhängigkeit vom Retinolsäure-Signaling.....	74
Abb. 17. Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Th1-Zellen und darmspezifische Migration nach Restimulierung durch LSEC.....	76
Abb. 18. Expression funktioneller RALDH in LSEC.....	79
Abb. 19. Internalisierung der Chemokine CXCL12 und CXCL10 in LSEC.....	82
Abb. 20. Einfluss der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR3 auf die Aufnahme ihrer Liganden CXCL12 bzw. CXCL10 in LSEC.	84
Abb. 21. Einfluss der Caveolae-vermittelten Chemokinaufnahme in LSEC.	86
Abb. 22. Einfluss der Clathrin-vermittelten Endozytose auf die Chemokinbereitstellung durch LSEC.	89
Abb. 23. Immobilisierung von Chemokinen durch LSEC mittels GAG.	91
Abb. 24. Hepatische Expression inflammatorischer Chemokine während einer Con A-induzierten AIH.	94
Abb. 25. Verlauf der Con A-induzierten AIH nach Gabe des Clathrin-Inhibitors CPZ. .	96
Abb. 26. Akkumulation endogener T-Zellen im Lebergewebe während der Con A-induzierten AIH und nach Gabe von CPZ.....	97
Abb. 27. Aktivierung endogener T-Zellen und Akkumulation CXCR3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen während der Con A-induzierten AIH und nach Gabe von CPZ.	100
Abb. 28. Migration transferierter CD4 ⁺ T-Zellen in die Leber unter homöostatischen oder entzündlichen Bedingungen und nach Gabe von CPZ.....	102
Abb. 29. Modell des enterohepatischen Kreislaufs.....	115
Abb. 30. Modell der Bereitstellung perivaskulärer Chemokine durch LSEC.....	121

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Sequenzen der Primer und Größe der Amplifikate in Basenpaare (bp).....	22
Tab. 2:	Fluorochrome und ihre Absorptions- und Emissionsmaxima.....	23
Tab. 3:	Antikörper für die Fluoreszenzmarkierung von Zellen.....	23
Tab. 4:	Antikörper für den Western Blot.....	25
Tab. 5:	Antikörper für die konfokale Laser- <i>Scanning</i> -Mikroskopie.....	25
Tab. 6:	Antikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	25
Tab. 7:	Antikörper für die Depletion	26
Tab. 8:	Kombinationen von Knochenmarkchimären	54

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein im Zuge der Evolution entwickelter Schutzmechanismus, der auf bestimmte Stimuli mit Immunität oder Toleranz reagiert und mit einer Kaskade von spezifischen Reaktionen antwortet, welche die Integrität des Gesamtorganismus sichern. Die Aufgaben des Immunsystems liegen in der Abwehr und Elimination eindringender Krankheitserreger sowie körpereigener apoptotischer oder entarteter Zellen. Die ausgelösten Immunantworten müssen fremd erkennen und eliminieren, aber gleichzeitig eine Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen (selbst) wahren. Krankheiten wie das *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) sind Resultat einer unzureichenden Immunabwehr, während Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn oder Autoimmunhepatitis sowie Allergien durch überschießende Immunantworten ausgelöst werden.

1.1.1 Angeborene und adaptive Immunität

Es wird zwischen einer angeborenen (unspezifischen) und adaptiven (erworbenen) Immunantwort unterschieden, wobei Wechselwirkungen zwischen beiden Immunantworten für eine effektive Immunabwehr notwendig sind (Hoebe, et al., 2004). Die angeborene Immunantwort umfasst unspezifische Mechanismen wie anatomische und physiologische Barrieren, die Phagozytose von eingedrungenen Erregern durch Makrophagen und neutrophile Zellen sowie das Auslösen von Entzündungsreaktionen, was zu einer Akkumulation von Plasmaproteinen, zu denen die Komponenten des Komplementsystems gehören, an der Infektionsstelle führt. Die angeborene

Immunantwort verwendet eine Reihe von keimbahnkodierten Rezeptoren, welche Wiederholungsmuster wie konservierte Kohlenhydrat- oder Lipidgruppen auf der Oberfläche von Pathogenen erkennen (Gordon, 2002; Medzhitov and Janeway, 2000). Die adaptive Immunantwort zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Diversität bei der Erkennung von Antigenen sowie durch Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus, wodurch bei Reinfektion die Immunantwort schneller und effektiver abläuft (Mackay, 1991). Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APC) an B-Zellen oder T-Zellen präsentiert. B-Zellen nutzen spezifische, membrangebundene Immunglobuline (B-Zellrezeptor) zur Antigenerkennung. Sie differenzieren nach Aktivierung zu Plasmazellen, die Immunglobuline derselben Spezifität wie die membrangebundene Form, sogenannte Antikörper, sezernieren. Diese zirkulieren im Körper und binden an Pathogene und ihre toxischen Produkte, was letztendlich zu deren Eliminierung führt. T-Zellen erkennen über ihren spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) von APC präsentierte Antigene. Aktivierte T-Zellen differenzieren zu Effektorzellen, die entweder zytotoxisch wirken oder andere Zellen des Immunsystems bei ihrer Funktion unterstützen.

1.1.2 Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen

Antigene werden in den sekundären lymphatischen Organen von professionellen APC, zu denen dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen gehören, als Peptide mittels Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) an T-Zellen präsentiert. Dabei werden MHC-Klasse I (MHC-I), MHC-Klasse II (MHC-II) und MHC-ähnliche Proteine (z.B. CD1) unterschieden. MHC-I/Peptid-Komplexe werden von T-Zellen, die den Korezeptor CD8 exprimieren (CD8⁺ T-Zellen), erkannt. Über MHC-I präsentierte Peptide stammen hauptsächlich von intrazellulären Proteinen. Bestimmte DC,

Makrophagen und Lebersinusendothelzellen (LSEC) präsentieren auch exogene Antigene über MHC-I, ein Vorgang, der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird (den Haan, et al., 2000; Kurts, et al., 1996; Limmer, et al., 2005). T-Zellen, die den Korezeptor CD4 exprimieren (CD4⁺ T-Zellen), erkennen über MHC-II präsentierte, durch Endozytose, Phagozytose oder Pinozytose aufgenommene exogene Antigene (Brigl and Brenner, 2004; Trombetta and Mellman, 2005; Zinkernagel, et al., 1997).

Interaktionen zwischen MHC/Peptid-Komplex und TCR sind allein nicht ausreichend für eine vollständige Aktivierung naiver T-Zellen. Zusätzliche Signale werden durch die von APC exprimierten kostimulatorischen Moleküle, zu denen CD80 und CD86 sowie die Adhäsionsmoleküle *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, ICAM-2 und *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 gehören, induziert. Die Abwesenheit kostimulatorischer Signale während der T-Zellaktivierung resultiert in Anergie und Deletion der T-Zellen (Damle and Aruffo, 1991; Smith-Garvin, et al., 2009; Van Seventer, et al., 1990).

Von professionellen APC aktivierte CD8⁺ T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen Effektorzellen, die ihre Zielzellen durch Freisetzung der toxisch wirkenden Granzyme und Perforin eliminieren oder über den CD95/CD95L-*Pathway* Apoptose induzieren (Andersen, et al., 2006; Chavez-Galan, et al., 2009). CD4⁺ T-Zellen differenzieren in Abhängigkeit von den Bedingungen unter denen die Aktivierung erfolgt zu verschiedenen Subpopulationen. T-Helfer (Th) 1-Zellen exprimieren Interferon- γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interleukin (IL)-2 und lösen eine zelluläre Immunantwort aus, indem sie unter anderem Makrophagen, Endothelzellen, B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen beeinflussen. Eine weitere Subpopulation sind die Th2-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren und bei der humoralen und allergischen

Immunantwort eine Rolle spielen, da sie zur Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen beitragen (Mosmann and Coffman, 1989; Rothoeft, et al., 2003).

1.1.3 Die Leber als immunologisches Organ

Die Leber ist ein Organ mit einzigartigem anatomischem Aufbau. Sie besteht aus einer Vielzahl von kleinen Leberläppchen, den Lobuli. In ihnen gelangt aufgrund eines dualen Blutzufusses vom Gastrointestinaltrakt kommendes, nährstoffreiches Blut über die Pfortader in die Leber, während Blut aus der systemischen Zirkulation über die Leberarterie in die Leber geleitet wird. Venöses und arterielles Blut mischen sich, werden durch die Sinusoide, einem Netzwerk von Kapillaren, welches das Leberparenchym durchzieht, geleitet und verlassen letztendlich das Organ über die Lebervene (Cunningham and Van Horn, 2003) (Abb. 1A).

Die Leber ist nicht nur ein wichtiges Organ des Stoffwechsels, sondern hat außerdem weit gefächerte immunologische Funktionen. Neben der Produktion von Akute-Phase-Proteinen während einer Entzündung, der Phagozytose apoptotischer Zellen sowie der Beseitigung von *waste molecules* kommt es in der Leber auch zur Deletion aktivierter T-Zellen (Huang, et al., 1994; Mehal, et al., 1999) und zur Induktion von peripherer und oraler Toleranz. Unter peripherer Toleranz wird der Schutz vor potentiell autoreaktiven T-Zellen verstanden. In Transplantationsmodellen wurde gezeigt, dass die Leber im Vergleich zu anderen Organen besser akzeptiert wird und dass die gleichzeitig mit der Leber erfolgende Transplantation eines weiteren Organs dessen Tolerierung und Überleben erhöht (Calne, 2000; Calne, et al., 1969; Kamada, et al., 1981; Rasmussen, et al., 1995). Als orale Toleranz wird die Toleranz gegenüber mit der Nahrung aufgenommenen Antigenen bezeichnet. Die Bedeutung der Leber für die Induktion oraler Toleranz wurde durch die Aufhebung der Toleranz gegenüber

Nahrungsantigenen nach Unterbrechung der Blutzufuhr vom Darm in die Leber mit Hilfe eines portokavalen Shunts gezeigt (Callery, et al., 1989). Toleranz kann durch Mechanismen wie Induktion von Anergie, Apoptose-induzierte Deletion aktivierter T-Zellen sowie Suppression der Proliferation von T-Zellen durch regulatorische T-Zellen vermittelt werden (Luth, et al., 2008; Parker and Picut, 2005; Wiegard, et al., 2005).

Neben den Hepatozyten, welche 60-80 % der Zellen in der Leber ausmachen und das Parenchym bilden, gibt es nicht-parenchymatische Zellen (NPC), zu denen LSEC, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen (Blouin, et al., 1977), DC (Lau and Thomson, 2003) sowie Lymphozyten (Doherty and O'Farrelly, 2000; Klugewitz, et al., 2004) gehören. Kupffer-Zellen sind hauptsächlich auf der luminalen Seite des Lebersinusendothels vorkommende leberresidente Makrophagen. Sie beseitigen Endotoxine und phagozytieren Mikroorganismen, apoptotische Zellen sowie Zelltrümmer (Naito, et al., 2004). Leberresidente DC befinden sich in der Nähe der Zentralvenen und Portalfelder, Gewebebereiche zwischen Pfortader und Leberarterie. In einer gesunden Leber wirken die DC tolerogen, aktivieren T-Zellen nur schwach und hemmen die Proliferation und Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen (Khanna, et al., 2000; Lau and Thomson, 2003; Prickett, et al., 1988). T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killer (NK)-Zellen und NKT-Zellen sind im Lumen der Sinusoide, dem Parenchym sowie den Portalfeldern zu finden (Doherty and O'Farrelly, 2000; Yamamoto, et al., 1999). NK-Zellen töten wie zytotoxische CD8⁺ T-Zellen mittels Perforin und Granzymen Zielzellen, induzieren über den CD95/CD95L-*Pathway* Apoptose und produzieren Zytokine, die wiederum die Funktion anderer Immunzellen beeinflussen (Nakatani, et al., 2004). NKT-Zellen haben ähnliche phänotypische und physiologische Merkmale wie NK-Zellen, exprimieren jedoch zusätzlich invariante $\alpha\beta$ -TCR, die über CD1-Moleküle präsentierte Lipidantigene erkennen. Nach Aktivierung wirken NKT-Zellen zytotoxisch und exprimieren sehr

schnell Th1- und Th2-Zytokine (Bendelac, et al., 2007). Im perisinusoidalem Bereich, dem Disse'schen Raum, liegen die Ito-Zellen. Im Zytoplasma von Ito-Zellen finden sich zahlreiche Fetttropfchen, in denen Vitamin A gespeichert ist (Blomhoff and Wake, 1991; Friedman, 1996). LSEC kleiden die Sinusoide aus und bilden eine endotheliale Barriere zwischen dem sinusoidalem Lumen und dem Parenchym (Fraser, et al., 1995) (Abb. 1B, C).

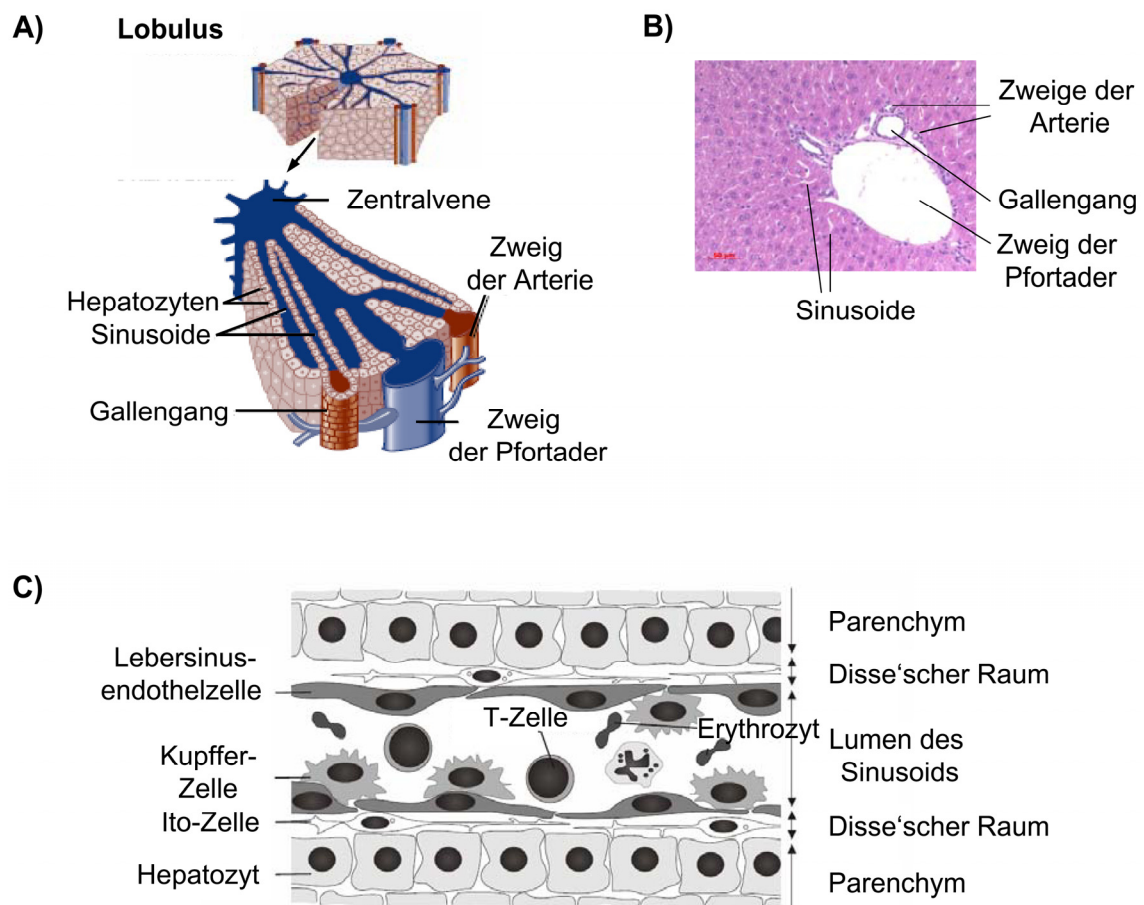


Abb. 1. Darstellung des immunologisch wichtigen Bereichs der Leber. (A) Schematischer Aufbau eines Lobulus. Das Blut gelangt über die Pfortader und die Leberarterie in den Lobulus und wird durch das Kapillarnetzwerk der Sinusoide zur Lebervene geleitet. Modifiziert nach Cunningham *et al.* (Cunningham and Van Horn, 2003). (B) Mit Hämatoxilin und Eosin gefärbter Schnitt des Lebergewebes. Der Standard repräsentiert 50 µm. (C) Querschnitt eines Sinusoids mit Lokalisation der Zellpopulationen. Modifiziert nach Lalor und Adams (Lalor and Adams, 2002).

1.2 Die gewebespezifische Migration von T-Zellen

T-Zellen rezirkulieren in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungs- und Differenzierungsstatus kontinuierlich aus dem Blut in bestimmte Gewebe und über die Lymphe zurück ins Blut (Gowans, 1966; Gowans and Knight, 1964; Sprent, 1973). Diese gewebespezifische Migration ist von zentraler Bedeutung für die Immunüberwachung und den Verlauf von durch Infektionen und Entzündungen ausgelösten Immunantworten. Naive T-Zellen rezirkulieren so lange zwischen den sekundären lymphatischen Organen, bis sie durch Antigenpräsentation, bei gleichzeitig geeigneter Kostimulation, aktiviert werden und zu Effektor/*Memory* T-Zellen differenzieren. Diese können aus dem Blut in bestimmte periphere Gewebe und an den Ort einer Entzündung einwandern. Die Migration von T-Zellen wird durch die Expression spezifischer *Homing*rezeptoren auf den T-Zellen, zu denen Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren gehören, sowie durch Chemokine und endotheliale Adhäsionsmoleküle kontrolliert (Butcher, et al., 1999; Salmi and Jalkanen, 1997).

1.2.1 Multi-Step-Modell der transendothelialen Migration

Damit T-Zellen aus dem Blut in ein Gewebe einwandern können, interagieren sie mit hoch spezialisierten Endothelien, zu denen die *high endothelial venules* (HEV) in den Lymphknoten und die postkapillären Venolen in den nicht-lymphatischen Geweben gehören. Zunächst adhärieren T-Zellen unter Blutflussbedingungen lose an ein Endothel. Die Wechselwirkungen zwischen T-Zellen und Endothelzellen werden durch die Bindung von Selektinen an ihre Liganden induziert. Sie sind schwach und werden ständig gelöst und neu gebildet, wodurch die T-Zellen auf dem Endothel entlang rollen (Lawrence and Springer, 1991; Ley, et al., 1991; Mayadas, et al., 1993; von Andrian, et

al., 1991). Nach ihrem Vorkommen werden die Mitglieder der Selektinfamilie als Endothel (E)-Selektin, Thrombozyten und Endothel (P)-Selektin sowie Leukozyten (L)-Selektin bezeichnet. Selektine sind Transmembranproteine, die zu den Lektinen gehören und an sialylierte Kohlenhydratgruppen binden (Patel, et al., 2002). Ein Ligand für alle Selektine ist der mit sialylierten und fukosylierten Oligosacchariden modifizierte *P-selectin glycoprotein ligand* (PSGL)-1, der von nahezu allen Leukozyten, aber auch von bestimmten Endothelzellen exprimiert wird (da Costa Martins, et al., 2007; McEver and Cummings, 1997; Rivera-Nieves, et al., 2006). Das auf den meisten T-Zellen exprimierte L-Selektin (CD62L) ermöglicht die Migration in sekundäre lymphatische Organe. Zu den L-Selektin-Liganden gehören neben PSGL-1 die *peripheral node addressins* sowie die Adhäsionsmoleküle *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*, *mucosal addressin cell adhesion molecule* (MAdCAM)-1 und CD34, die z.B. von den HEV exprimiert werden (Ley and Kansas, 2004) (Abb. 2).

Nach der losen Adhäsion von T-Zellen an das Endothel binden auf der luminalen Endothelzelloberfläche immobilisierte Chemokine an Chemokinrezeptoren der T-Zellen und induzieren über intrazelluläre Signalkaskaden die Aktivierung von Integrinen (Shamri, et al., 2005) (Abb. 2). Die daraus resultierende Konformationsänderung im Integrin führt zu einer Steigerung der Integrinaffinität und dadurch zur Bindung an die von Endothelzellen exprimierten Adhäsionsmoleküle, wodurch eine feste Adhäsion der T-Zellen an das Endothel ermöglicht wird (Campbell, et al., 1998; Chan, et al., 2001; Constantin, et al., 2000). Das *lymphocyte function associated antigen-1* (LFA-1) und das *very late antigen-4* (VLA-4) gehören zur Familie der Integrine und interagieren mit Mitgliedern der Superfamilie der Immunglobuline, den *cellular adhesion molecules*, zu denen ICAM-1 und VCAM-1 gehören (Abb. 2).

Die adhärenierten T-Zellen durchqueren im letzten Schritt das Endothel und wandern in das angrenzende Gewebe ein, wo sie durch Chemokine und andere chemotaktische Mediatoren weitergeleitet werden. Die Transmigration durch das Endothel kann dabei parazellulär durch geöffnete *junctions* (Liao, et al., 1997; Ostermann, et al., 2002; Schenkel, et al., 2002) oder transzellulär mittels Caveolae-Vesikel erfolgen (Millan, et al., 2006) (Abb. 2).

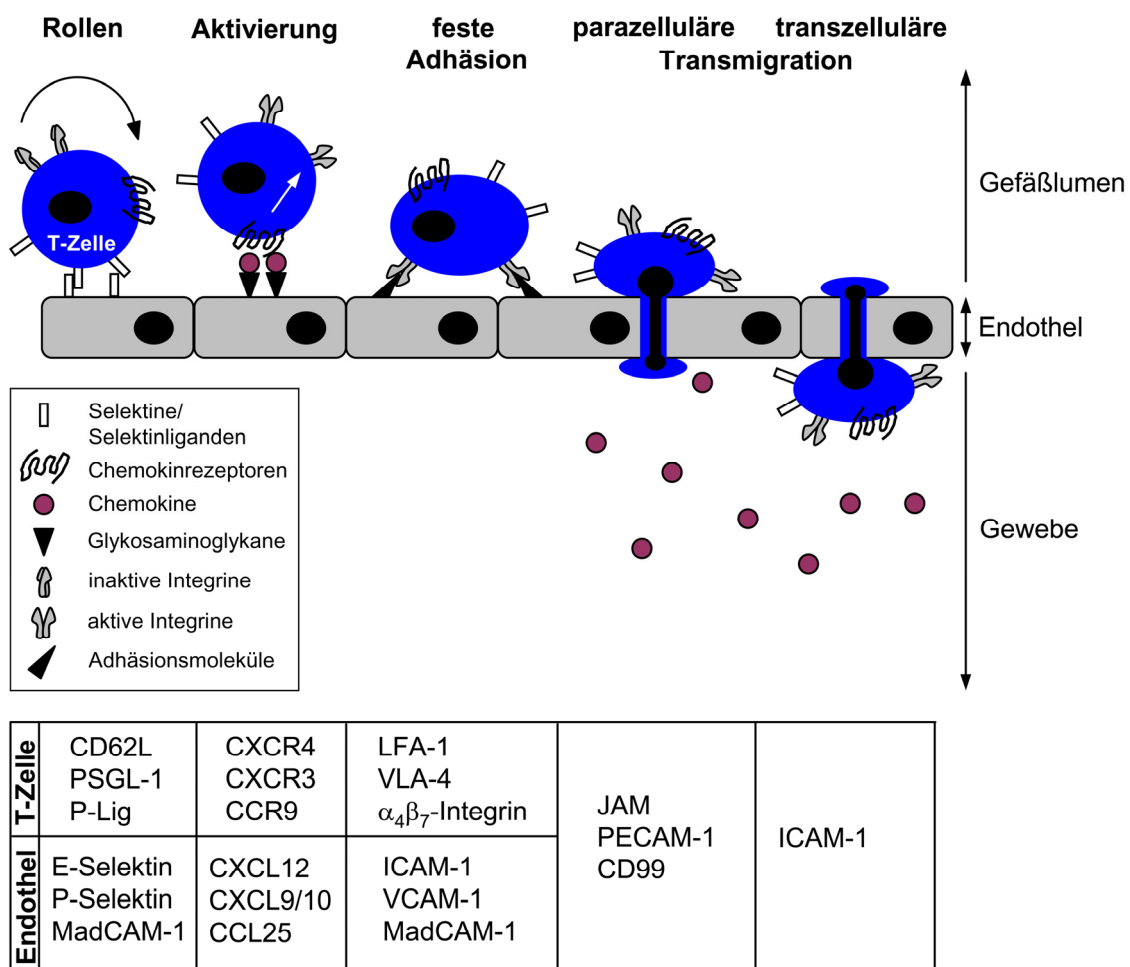


Abb. 2. Multi-Step-Modell der transendothelialen Migration von T-Zellen. Durch die sequentiell ablaufenden Schritte des selektinvermittelten Rollens entlang des Endothels, der chemokinabhängigen Integrinaktivierung, der integrinabhängigen festen Adhäsion an das Endothel und der Transmigration sowie die jeweils notwendigen Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen, Chemokinrezeptoren und ihren Liganden erfolgt die Einwanderung von T-Zellen aus dem zirkulierenden Blut in ein Gewebe. Abbildung nach Ley *et al.* (Ley, et al., 2007) sowie Schaerli und Moser (Schaerli and Moser, 2005). JAM, *junctional adhesion molecules*; PECAM-1, *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*.

1.2.2 Regulation der gewebespezifischen Migration

Sowohl der Ort der Antigenpräsentation und das *microenvironment* als auch die Art der APC-Population sind entscheidend für die Induktion eines gewebespezifischen *Homing*phänotyps bei T-Zellen. So induziert eine T-Zellaktivierung durch DC aus den mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Peyerschen Plaques (PP) die Expression von *Homing*rezeptoren, die es den T-Zellen ermöglichen, in das Darmgewebe einzuwandern (Mora, et al., 2003; Stagg, et al., 2002). Durch DC aus der Haut aktivierte T-Zellen exprimieren *Homing*rezeptoren, die notwendig sind für die Migration in das Hautgewebe (Dudda, et al., 2005; Mora, et al., 2005).

In das Darmgewebe migrierende Effektor/*Memory* T-Zellen exprimieren die *Homing*rezeptoren $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und den CC-Chemokinrezeptor (CCR)9 (Hamann, et al., 1994; Papadakis, et al., 2000; Wagner, et al., 1996; Zabel, et al., 1999), deren Liganden MAdCAM-1 bzw. das CC-Chemokin (CCL)25 von den postkapillären Venolen der Lamina propria und CCL25 zusätzlich von den Epithelzellen des Dünndarms exprimiert werden (Kunkel, et al., 2000; Nakache, et al., 1989; Papadakis, et al., 2000; Wurbel, et al., 2000). Durch Expression von P-Selektin-Ligand (P-Lig) und E-Selektin-Ligand (E-Lig) (Picker, et al., 1991; Tietz, et al., 1998) sowie CCR4 und/oder CCR10 (Campbell, et al., 1999; Morales, et al., 1999; Reiss, et al., 2001) können Effektor/*Memory* T-Zellen in das Hautgewebe einwandern, das in den postkapillären Venolen die Liganden P- und E-Selektin (Weninger, et al., 2000) sowie CCL17 und CCL27 exprimiert (Campbell, et al., 1999; Homey, et al., 2002).

Ein Metabolit des Vitamin A, die Retinolsäure, ist essentiell für die Induktion von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 sowie die Suppression von P-Lig und E-Lig auf durch DC aus dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT-DC) aktivierte T-Zellen. GALT-DC exprimieren Retinaldehydrogenasen (RALDH), welche die Umsetzung von Vitamin A

zu Retinolsäure ermöglichen (Iwata, et al., 2004; Johansson-Lindbom, et al., 2005; Mora, et al., 2005).

1.2.3 Chemokine und ihre Funktion bei der T-Zellmigration

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die bewirken, dass T-Zellen und andere Leukozyten entlang eines Gradienten gerichtet wandern, ein Prozess der als Chemotaxis bezeichnet wird (Chensue, 2001).

Chemokine werden in zwei funktionelle Kategorien unterteilt, in homöostatische und inflammatorische Chemokine. Erstere (z.B. CXC-Chemokin (CXCL)12) werden konstitutiv unter nicht-entzündlichen Bedingungen exprimiert und sind mitverantwortlich für die Rezirkulation von Lymphozyten und deren Einwanderung in die sekundären lymphatischen Organe sowie für die Immunüberwachung gesunder, peripherer Gewebe. Die Expression von inflammatorischen Chemokinen (z.B. CXCL9, CXCL10) ist unter entzündlichen Bedingungen hoch reguliert und die Chemokine werden von Gewebezellen, aktivierten Leukozyten, aber auch zahlreichen Tumoren exprimiert. Inflammatorische Chemokine kontrollieren die Rekrutierung von Effektorzellen und bestimmen die Zusammensetzung von inflammatorischen Zellinfiltraten (Gerard and Rollins, 2001; Moser and Willmann, 2004; Moser, et al., 2004).

Chemokine wirken auf ihre Zielzellen durch Bindung an Chemokinrezeptoren, die zur Familie der 7-Transmembran-Domänen-Rezeptoren gehören. Diese induzieren über heterotrimere G-Proteine intrazelluläre Signalkaskaden, welche letztendlich T-Zellfunktionen wie Adhäsion und Chemotaxis auslösen (Loetscher, et al., 2000; Proudfoot, 2002; Schraufstatter, et al., 2001).

Viele perivaskuläre Zellpopulationen exprimieren unter homöostatischen, aber vor allem unter inflammatorischen Bedingungen Chemokine. Damit diese auf der luminalen

Seite von Endothelzellen zur Verfügung stehen, müssen sie das Endothel passieren. Ein möglicher Mechanismus ist die Transzytose, ein Prozess bei dem über Endozytose aufgenommenes extrazelluläres Material innerhalb von vesikulären Kompartimenten durch eine Zelle transportiert und auf der gegenüber liegenden Seite durch Exozytose unverändert freigesetzt wird (Mellman, 1996; Mostov, 1994; Tuma and Hubbard, 2003). Chemotaxis entlang eines löslichen Chemokingradienten ist an der Blut-Endothel-Grenze nicht möglich, da aufgrund des Blutflusses die Chemokine weggewaschen werden. Zusätzlich können lösliche Chemokine zirkulierende Leukozyten vor der Adhäsion an das Endothel aktivieren, wodurch keine transendotheliale Migration mehr erfolgt (Rot, 1992). Deshalb wird angenommen, dass Chemokine auf der luminalen Endothelseite durch Bindung an Proteoglykane, zu denen die Glykosaminoglykane (GAG) gehören, immobilisiert werden (Tanaka, et al., 1993). GAG besitzen aufgrund ihrer zahlreichen Sulfat- und Carboxygruppen eine hohe negative Ladung, welche es ermöglicht, die hauptsächlich basischen Chemokine über elektrostatische Wechselwirkungen zu binden (Kuschert, et al., 1999).

1.2.4 Das Lebersinusendothel - ein Sonderfall

Die Einwanderung von T-Zellen und anderen Leukozyten in das Lebergewebe erfolgt im Gegensatz zu anderen peripheren Geweben nicht in postkapillären Venolen sondern in den Sinusoiden, wo zirkulierende Zellen direkten Kontakt zum Lebersinusendothel haben. Das Lebersinusendothel unterscheidet sich morphologisch von anderen vaskulären Endothelien, da es keine Basalmembran besitzt, in Siebplatten angeordnete *Fenestrae* ausbildet und nur durch den Disse'schen Raum von den angrenzenden Hepatozyten getrennt ist (Wisse, 1972; Wisse, et al., 1985). Durch die *Fenestrae* ist kein ungehinderter Durchtritt von Makromolekülen oder

Leukozyten zum Parenchym möglich (Kempka and Kolb-Bachofen, 1988; Schlepper-Schafer, et al., 1986), T-Zellen können jedoch durch Ausbildung zytoplasmatischer Zellausläufer durch die *Fenestrae* hindurch mit den Hepatozyten interagieren (Warren, et al., 2006).

Im Gegensatz zu anderen Organen ist in der Leber das selektinabhängige Rollen der T-Zellen nicht notwendig für die Transmigration durch das Lebersinusendothel (Wong, et al., 1997). Der langsame Blutfluss und der geringe Durchmesser der Sinusoide (5-7 μm) sind ausreichend für erste Interaktionen zwischen T-Zellen und LSEC (MacPhee, et al., 1995). Diese exprimieren keine Selektine (Steinhoff, et al., 1993), jedoch eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, VCAM-1 (Steinhoff, et al., 1993) und *vascular adhesion protein* (VAP)-1 (McNab, et al., 1996). Somit sind die chemokinabhängige Aktivierung von Integrinen und deren anschließende Bindung an endotheliale Adhäsionsmoleküle der erste essentielle Schritt bei der transendothelialen Migration von T-Zellen durch das Lebersinusendothel.

LSEC unterscheiden sich von anderen Endothelzellen auch dahingehend, dass sie nicht-professionelle APC sind, die Antigene mittels des Mannose-Rezeptors aufnehmen (Knolle and Gerken, 2000; Knolle, et al., 1998), diese über MHC-I oder MHC-II an CD8^+ T-Zellen (Limmer, et al., 2000; Limmer, et al., 2005) bzw. CD4^+ T-Zellen (Knolle, et al., 1998; Kruse, et al., 2009; Lohse, et al., 1996) präsentieren sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40, ICAM-1 und VCAM-1 exprimieren (Knolle and Gerken, 2000; Knolle and Limmer, 2003). Die MHC-I-restringierte Kreuzpräsentation exogener Antigene durch das Lebersinusendothel führt zur CD8^+ T-Zelltoleranz. LSEC-stimulierte CD8^+ T-Zellen exprimieren keine proinflammatorischen Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$ oder IL-2 und zeigen keine zytotoxische Aktivität (Limmer, et al., 2000). Durch LSEC aktivierte naive CD4^+ T-Zellen

differenzieren nicht zu Th1-Zellen (Knolle, et al., 1999) sondern zu regulatorischen T-Zellen, welche die Proliferation von naiven CD4⁺ T-Zellen *in vitro* und den Verlauf eine Autoimmunhepatitis *in vivo* supprimieren (Kruse, et al., 2009). Die LSEC-induzierte T-Zelltoleranz trägt somit zum Schutz des Organismus vor unerwünschten Immunreaktionen gegenüber löslichen, zirkulierenden Nahrungs- und Selbst-Antigen bei.

2 Zielsetzung

Vaskuläre Endothelien üben eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Extravasation von T-Zellen aus. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Lebersinusendothels auf die gewebespezifische Migration von CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen und damit weiterführende Einblicke in die Bedeutung der Leber als immunologisches Organ für den Verlauf von Immunantworten oder die Induktion von Toleranz zu gewinnen. Folgende Fragestellungen wurden dabei näher betrachtet:

1. Hat die Präsentation von Antigenen durch das Lebersinusendothel einen Einfluss auf die Rekrutierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in die Leber?

Es wurden die antigenabhängige Adhäsion und transendotheliale Migration von CD4⁺ T-Zellen untersucht und im Chimärenmodell einer auf LSEC beschränkten Antigenpräsentation die Migration antigenspezifischer Th1-Zellen *in vivo* analysiert.

2. Induziert das Lebersinusendothel einen darmspezifischen *Homing*phänotyp bei CD4⁺ T-Zellen und welche molekularen Mechanismen liegen dem zugrunde?

In *in-vitro*-Kokulturen wurden naive CD4⁺ T-Zellen durch LSEC antigenspezifisch aktiviert und hinsichtlich der Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren und der Migration in das Darmgewebe *in vivo* analysiert.

3. Welche Bedeutung hat eine Chemokinbereitstellung durch LSEC für die Migration von CD4⁺ T-Zellen? Können Interventionen in die endotheliale Chemokinbereitstellung den Verlauf einer Autoimmunhepatitis beeinflussen?

Es wurden Mechanismen der Chemokinbereitstellung durch LSEC *in vitro* sowie der Einfluss eines Inhibitors der endothelialen Chemokintranszytose auf den Verlauf einer Concanavalin A-induzierten T-Zell-vermittelten Hepatitis im Mausmodell untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Wildtypstämme (WT) C57BL/6 (H-2^b) und BALB/c (H-2^d) wurden von den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (Charité Universitätsmedizin Berlin) oder von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die OVA-TCR-transgenen Stämme OT-II (H-2^b) (Barnden, et al., 1998) und DO11.10 (H-2^d) (Murphy, et al., 1990), deren TCR das OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid im Kontext von I-A^b/I-A^d erkennen (Robertson, et al., 2000), wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin) erworben. Von Taconic Germantown (NY, USA) wurden MHC-II^{-/-}-Mäuse des Stammes ABBN5-M (H-2^b) erworben (Grusby, et al., 1991). CXCR3^{-/-}-Mäuse (H-2^b) (Hancock, et al., 2000) wurden von PD Dr. Uta Höpken (Abteilung Molekulare Tumorgenetik und Immunogenetik, Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) zur Verfügung gestellt. Transferrin-Ovalbumin (TF-OVA)-Mäuse (H-2^b), die OVA in den Hepatozyten unter der Kontrolle des Transferrin-Promoters exprimieren, wurden von PD Dr. Eckardt Schott (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Charité Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt. Ein OVA-Fragment, welches auch das MHC-II-Epitop enthält, ist dabei verbunden mit der Membran-Anker-Domäne des Transferrinrezeptors, so dass das Fusionsprotein in der Zellmembran verankert ist (Derkow, et al., 2007). Vitamin A-defiziente (Vit A⁻) Mäuse (H-2^d) wurden wie beschrieben (Iwata, et al., 2004) von Balint Szilagyi (Experimentelle Rheumatologie, Charité Universitätsmedizin Berlin) generiert und zur Verfügung gestellt.

Alle Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen entsprechend nationaler Richtlinien gehalten. Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet. Alle Tiertötungen und Tierversuche waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales

(Berlin) unter der Tötungsnummer T 0183/07 und den Tierversuchsnummern G 0336/08 und G 0022/09 genehmigt.

3.2 Reagenzien und Kits

3.2.1 Reagenzien

Accutase-Lösung	PAA Laboratories, Cölbe
<i>all-trans</i> Retinol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
AMD 3100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Gibco über Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calcein AM	Molecular Probes über Invitrogen, Karlsruhe
5-,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester (CFSE)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Chemokine (murines CXCL9, CXCL10, CXCL12)	R&D Systems, Wiesbaden
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Chlorpromazin (CPZ)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Chondroitinase ABC, <i>Proteus vulgaris</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Collagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim
Collagenase Typ IV	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Concanavalin A (Con A)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
⁵¹ Cr-Natriumchromat-Lösung (1-5 mCi/Gefäß)	GE Healthcare, München
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche Pharma, Grenzach-Whyhlen
DNA-Leiter (100 Bp)	Carl Roth, Karlsruhe
DNase I	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Dulbesso's Modified Eagle Medium (DMEM; mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin)	Invitrogen, Karlsruhe
Enrofloxacin (Baytril®)	Bayer Schering Pharma, Berlin
Entellan®	Merck, Darmstadt
Eosin Y Lösung (0,5 %)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ethanol	J.T.Baker, Mallinckrodt, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehydlösung (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS), hitze- inaktiviert: 30 min, 56°C	Linaris, Wertheim
Filipin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Fluoresbrite™ <i>Microspheres</i>	Polysciences, Warrington, PA, USA
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St Leon-Rot
Giemsalösung	Fluka über Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>Hanks balanced salt solution</i> (HBSS), mit Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Ionen	Biochrom, Berlin
Heparinase I, <i>Flavobacterium heparinum</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Heparin (5000 U/ml)	Biochrom, Berlin
humanes CXCL12-AlexaFluor 647®	Almac Group, Craigavon, UK
humanes CXCL10-AlexaFluor 647®	
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure- Puffer-Lösung (HEPES; 1M)	Biochrom, Berlin
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
LE 540	Wako, Richmond, VA, USA
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Schlecker, Berlin
Mayers Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt
MicroBeads, MultisortBeads und Release Reagent	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	Biochrom, Berlin
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
Nicht-essentielle Aminosäuren-Lösung (NEAA; 10 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Nonidet® P40	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Novalyse	Dianova, Hamburg
Nycodenz	Progen Biotechnik, Heidelberg
Nystatin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
OVA-Peptid, Sequenz: ³²³ ISQAVHAAHAEINEAGR ³³⁹	Institut für Biochemie, Humboldt-Universität zu Berlin
Paraffin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/10000µg/ml)	Biochrom, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>Phosphate buffered salt solution</i> (PBS), ohne Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Ionen	PAA Laboratories, Cölbe
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Protein-Marker PAGE-Ruler™	MBI Fermentas, St Leon-Rot
Rekombinante murine Cytokine: IFN γ , IL-12, IL-2	R&D Systems, Wiesbaden
TNF α	ImmunoTools, Friesoythe
Restriktionsendonuklease BglII	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Restriktionsendonuklease EcoRI	BioLabs, Berlin
RNAPure™	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) mit und ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Taq DNA Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt am Main
TaqMan® Sonden/Primer-Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

3.2.2 Kits

ALDEFLUOR® Kit	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich
Amersham™ ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
CD4 ⁺ T-Zell-Isolationskit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
pCR®2.1-TOPO® Plasmid-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
Streptavin/Alkalische Phosphatase Kit	DakoCytomation, Hamburg
TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
QIAprep® Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

3.3 Materialien und Geräte

3.3.1 Materialien

Gefäße zur Plasmagewinnung	Kabe Labortechnik, Nürnbrecht-Elsenroth
<i>Escherichia coli</i> (TOP10)	Invitrogen, Karlsruhe
Einmal-Spritzen und -Kanülen	B. Braun Melsungen, Melsungen
MACS-Säulen, -Magnete, -Ständer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe

Polyvinylidenfluorid-Membran (0,22 µm Porengröße)	Millipore, Billerica, MA, USA
Prä-Separationsfilter	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Rundsiebe	Carl Roth, Karlsruhe
Transwell®-Einsätze für 24-Well-Platten, 5 µm Porendurchmesser	Corning Costar, über Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Zellkulturplatten	Corning Costar oder Nunc, beides über Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Zellsiebe (70 µm und 100 µm Poren)	Becton Dickinson, Heidelberg

3.3.2 Geräte

Analysegerät Roche® Modular Analyzer	Roche Diagnostics, Mannheim
Axiolmager Z1 Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging, Heidelberg
Bestrahlungsgerät Gammacell® 40 Exactor	Best Theratronics, Ottawa, Kanada
CO ₂ -Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Durchflusszytometer FACSCanto II	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Fluoreszenz- und Durchlicht-Geldokumentationsgerät BioVision	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Fluoreszenzmessgerät Spectramax Gemini EM	Molecular Devices, Ismaning
Gamma-Counter WIZARD®	Wallac, Turku, Finnland
Inkubationsschüttler TH 25	Edmund Bühler, Tübingen
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 META	Carl Zeiss MicroImaging, Heidelberg
Luminescent Image Analyzer LAS-4000	Fujifilm, Düsseldorf
Mikrotom Microm HM 325	Thermo Scientific, Schwerte
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Phasenkontrastmikroskop für Zellkultur	Helmut Hund, Wetzlar
Real-Time PCR System StepOnePlus™	Applied Biosystems, Darmstadt
Rotlichtlampe Osram Theratherm	Osram, München

Spektralphotometer NanoDrop	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Sterilbank HERAsafe®	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Thermocycler T 3000	Biometra, Göttingen
Zellsorter FACS Aria	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugen: Megafuge 2.R, Multifuge 1S- R, Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte

3.4 Primer

Die verwendeten Primer wurden mit dem Programm Primer3 (Geneious, Auckland, Neuseeland) entworfen und von der Firma TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert. Tabelle 1 gibt die Sequenzen der *forward* und *reverse* Primer in 5'→3' Richtung an.

Tab. 1: Sequenzen der Primer und Größe der Amplifikate in Basenpaare (bp)

Ziel-Gen	Primer	Größe der cDNA (bp)
RALDH1	forward: AGACAGGCTTTCCAGATTGGCTCT reverse: GCGACACAACATTGGCCTTGATGA	736
RALDH2	forward: ACCGTGTTCTCCAACGTCAGTATGAT reverse: TGGAAGGACTCAAAGCCACTGTCA	859
RALDH3	forward: TGGCACGAATCCAAGAGTGGAAGA reverse: TTGAAGAACTCCCTGGTGAGCA	832
RALDH4	forward: TGCTTCCCACGGTGATAACAGACA reverse: TGAGTCATCTCCCAGGCCTTTGTT	629
Glycerinaldehyd-3- phosphat-Dehydro- genase (GAPDH)	forward: CATCCTGCACCACTCAACTGC reverse: ACGCCACAGCTTTCCAGAGG	143

3.5 Antikörper

Tab. 2: Fluorochrome und ihre Absorptions- und Emissionsmaxima

Fluorochrom	Absorption (nm)	Emission (nm)
AlexaFluor 488	495	519
AlexaFluor 555	555	565
AlexaFluor 647	650	668
Allophycocyanin (APC)	650	660
Indodicarbocyanin (Cy5)	650	670
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	495	520
R-phycoerythrin (PE)	564	575
Propidiumjodid (PI)	550	650

Tab. 3: Antikörper für die Fluoreszenzmarkierung von Zellen

Spezifität	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Herkunft
Maus $\alpha_4\beta_7$ -Integrin	DATK32	Ratte IgG2a	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus CCR9	242503	Ratte IgG2b	PE	R&D Systems, Wiesbaden
Maus CD4	RM4-5	Ratte IgG 2a	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
	GK1.5	Ratte IgG2b	Cy5	Deutsches Rheuma- Forschungszentrum (DRFZ), Berlin
Maus CD11c	N418	Hamster IgG	PE	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Maus CD16/CD32	2.4G2	Ratte IgG2b		DRFZ, Berlin
Maus CD25	PC6.1	Ratte IgG1	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus CD31	MEC 13.1	Ratte IgG2a	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus CD45	30-F11	Ratte IgG2b	APC	BioLegend, San

				Diego, CA, USA
Maus CD45RB	16A	Ratte IgG2a	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus CD54 (ICAM-1)	3E2	Armenian Hamster IgG1	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus CD62L	MEL-14	Ratte IgG2a	Cy5	DRFZ, Berlin
Maus CD69	H1.2F3	Armenian Hamster IgG1	Biotin	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Maus CD80	16-10A1	Armenian Hamster IgG2	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus CD90.2	53-2.1	Ratte IgG2a	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus CD146	ME-9F1	Ratte IgG2a	FITC PE	DRFZ, Berlin BioLegend, San Diego, CA, USA
Maus CXCR3	CXCR3- 173	Armenian Hamster IgG1	PE	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Maus IFN γ	XMG1.2	Ratte IgG1	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus MHC-II	M5/114	Ratte IgG2a	Cy5	DRFZ, Berlin
Maus VCAM-1	6C71	Ratte IgG2a	Cy5	DRFZ, Berlin
Maus P-Selektin/ Mensch IgG Fc Chimäre				Becton Dickinson, Heidelberg
Mensch IgG		Affe, humanes Fc- Fragment	PE	Dianova, Hamburg
Biotin		Streptavidin	APC	Becton Dickinson, Heidelberg

Tab. 4: Antikörper für den Western Blot

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
Kaninchen anti-Maus RALDH1	polyklonal, H-85	unkonjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Maus anti- β -Actin	monoklonal, AC-15	unkonjugiert	Sigma Aldrich, Steinheim
Ziege anti-Kaninchen IgG	polyklonal	Meerrettich-Peroxidase	Dako, Glostrup, Denmark

Tab. 5: Antikörper für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
Maus anti-Maus Clathrin	monoklonal, 3F133	unkonjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Maus anti-Maus Caveolin-1	monoklonal, 7C8	unkonjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Ziege anti-Maus IgG	polyklonal	AlexaFluor 488	Invitrogen Karlsruhe

Tab. 6: Antikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
Kaninchen anti-Maus CD3	polyklonal, N1580	unkonjugiert	DakoCytomation, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen IgG	polyklonal	Biotin	DakoCytomation, Hamburg
Kaninchen anti-Maus CXCL9	polyklonal, H49	unkonjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Esel anti-Ratte IgG	polyklonal	AlexaFluor 488	Dianova, Hamburg
Esel anti-Kaninchen IgG		AlexaFluor 555	

Tab. 7: Antikörper für die Depletion

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
Ziege anti-Maus IL-4	11B11	unkonjugiert	DRFZ, Berlin

3.6 Medien und Puffer

Blockierungspuffer	0,1 % Tween 20, 10 mM Tris, 154 mM NaCl, 5 % Magermilchpulver
Erythrozyten-Lyse-Medium	10 mM KHCO ₃ , 155 mM NH ₄ Cl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5
Immunpräzipitationspuffer	50 mmol/l Tris-HCl (pH 7,6), 10 mmol/l NaCl, 2 mmol/l EDTA, 1 mmol/l Phenylmethylsulfonyl-Fluorid, 10 µg/ml Aprotinin, 1% Nonidet® P40
Komplett-DMEM (cDMEM)	DMEM, 10 % FCS, 2 % Natriumpyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin, 25 mM HEPES, 1 % NEAA, 0,1 % β-Mercaptoethanol
Komplett-RPMI (cRPMI)	RPMI 1640 mit GlutaMAX™ und HEPES, 10 % FCS, 1 % Natrium-Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 % β-Mercaptoethanol
Migrationsmedium	RPMI 1640 ohne Phenolrot, 5 g/l BSA, 1 % Natriumpyruvat, 0,1 % β-Mercaptoethanol
Paraformaldehydlösung	1xPBS, 2 g/l PFA, pH 7
PBS/BSA	1xPBS, 2 g/l BSA
Puffer für P-Lig-Färbung	1xHBSS, 2 g/l BSA
Saponin-Puffer	1xPBS, 2 g/l BSA, 5 g/l Saponin
Th1-Medium	cRPMI, 5 µg/ml OVA-Peptid ₃₂₃₋₃₃₉ , 20 ng/ml IFNγ, 10 ng/ml IL-12, 5 µg/ml anti-IL-4
Verdaumedium I	RPMI 1640 mit GlutaMAX™ und HEPES, 5 % FCS, 0,05 % Collagenase Typ IV, 0,002 % DNase I
Verdaumedium II	RPMI 1640 mit GlutaMAX™ und HEPES, 5 % FCS, 0,1 % Collagenase D, 0,005 % DNase I
Waschmedium (wRPMI)	cRPMI mit 5 % FCS

3.7 Isolation und Differenzierung definierter Zellpopulationen

3.7.1 Prinzip der Magnet- und Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung

Zur Isolation bestimmter Zellpopulationen wurde die Methode der magnetischen Zellsortierung (*magnetic cell sorting*, MACS) angewendet. Dabei wurden von den Zellen spezifisch exprimierte Oberflächenmoleküle mittels monoklonaler Antikörper, an die etwa 50 nm große, paramagnetische Partikel (MicroBeads) gekoppelt sind, markiert. Beim anschließenden Durchfluss der Zellsuspension durch eine im Magnetfeld befindliche ferromagnetische Säule wurden die von den Microbeads markierten Zellen im Magnetfeld zurückgehalten, während alle unmarkierten Zellen durch Spülen der Säule mit PBS/BSA ausgewaschen wurden. Nach Entfernen des Magnetfeldes konnte durch erneutes Spülen der Säule die markierte Zellpopulation eluiert werden (Miltenyi, et al., 1990).

Bei der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) wurden Zellpopulationen mittels fluorochromgekoppelter monoklonale Antikörper sortiert. Dabei wurde die Zellsuspension vom Zellsorter FACSria aufgenommen. Im Zellsorter wurden die Zellen mit einem Laserstrahl definierter Wellenlänge angeregt. Daraufhin streuten die Zellen das Licht und die fluorochrommarkierten Zellen emittierten Fluoreszenzlicht, das spezifisch für die verwendeten Fluorochrome war. Das Streulicht ist ein Maß für die Größe (*forward light scatter*, FSC) und Granulität (*sideward light scatter*, SSC) der Zellen. Anhand der ermittelten Parameter wurde die zu separierende Zellpopulation definiert. Die Zellen wurden in einer Trägerflüssigkeit zum Abrißpunkt transportiert, wo der Flüssigkeitsstrahl durch einen Schwingungsgeber stabilisiert wurde und sich Tröpfchen, die einzelne Zellen enthielten, bildeten. Wenn eine Zelle isoliert werden sollte, wurden die Tröpfchen beim Abreißen vom Flüssigkeitsstrahl mit einer

elektrischen Ladung versehen und beim Durchfliegen eines elektrischen Feldes in die jeweiligen Auffangbehälter abgelenkt.

Bei allen Zellisolationen wurden die Zellsuspensionen in einer Zelldichte von 1×10^8 /ml PBS/BSA mit Antikörpern für 10 min bei 4°C inkubiert, während die Inkubation mit MicroBeads in einer Zelldichte von 2×10^8 /ml PBS/BSA für 15 min bei 4°C erfolgte.

3.7.2 Isolation von nicht-parenchymatischen Zellen der Leber und Lebersinusendothelzellen (LSEC)

Zur Isolation von NPC wurden die Lebern durch Kanülierung der Pfortader mit 2-3 ml Verdaumedium I gespült und nach dem Abtrennen der Gallenblase entnommen. Die Lebern wurden im Verdaumedium I mittels einer Schere und Pinzette zerkleinert und für 15 min bei 37°C mit 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde in wRPMI aufgenommen, mittels eines Spritzenkolbens durch ein Metallsieb gepresst und über ein Zellsieb (Porendurchmesser 100 µm) gegeben. Durch eine Zentrifugation bei 20 g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurden Gewebestandteile von der Einzellzellsuspension getrennt. Nach einer weiteren Zentrifugation (600 g, 8 min, RT) wurden die Erythrozyten in der Zellsuspension durch Inkubation im Erythrozyten-Lyse-Medium für 5 min bei 4°C lysiert. Anschließend erfolgte die Abtrennung der Hepatozyten mittels eines Gradienten. Dafür wurden die Zellen in einer 26 %igen Nycodenzlösung (Dichte: 1,136 g/l) unter wRPMI unterschichtet und bei 1300 g für 20 min bei RT zentrifugiert. Die NPC befanden sich in der Interphase, welche abgenommen und mit PBS/BSA gewaschen wurde. Abschließend wurden die NPC mit einer Neubauer-Zählkammer in Anwesenheit von Trypanblau gezählt. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen

unter dem Mikroskop weiß vor blauem Hintergrund. In tote Zellen dringt Trypanblau ein und färbt diese dunkelblau an. Somit ermöglichte die Trypanblaufärbung eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen.

Zur Isolation von LSEC wurden NPC mit einem anti-Fc γ -Rezeptor II/III Antikörper (anti-Maus CD16/CD32; 1 μ g/1x10⁶ Zellen) zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Antikörper an von den Zellen exprimierte Fc-Rezeptoren sowie dem endothelspezifischen anti-CD146-FITC Antikörper (Schrage, et al., 2008a) inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit anti-FITC Microbeads. CD146⁺ LSEC wurden mittels MACS mit einer Reinheit von maximal 96 % isoliert und vor der Verwendung für Kokulturen, Proliferations-, Adhäsions- und Transmigrationsassays zur Adhäsion der Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Für Reverse-Transkription-PCR-Analysen verwendete LSEC wurden mittels FACS weiter aufgereinigt. Dazu erfolgte zunächst eine wie oben beschriebene Isolation von CD146⁺ LSEC. Dann wurden die Zellen mit einem anti-ICAM-1-PE Antikörper markiert und alle ICAM-1⁺ LSEC am FACSaria isoliert. Die Reinheit der LSEC stieg dabei auf 99 % an.

Über Nacht kultivierte LSEC (1x10⁶/ml cDMEM) wurden hinsichtlich enthaltener kontaminierender APC untersucht. Dazu wurden nach sorgfältigem Waschen der *Monolayer* die adhärenenten Zellen mit Accutase abgelöst, mit PBS/BSA gewaschen und mit einem anti-CD11c, anti-MHC-II oder anti-CD45 Antikörper zusammen mit dem LSEC-spezifischen anti-CD146 (Schrage, et al., 2008a) oder dem endothelspezifischen anti-CD31 Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Dabei waren alle adhärenenten Zellen CD146⁺ CD31⁺ LSEC und die Zellpopulation enthielt keine CD11c⁺ DC, andere MHC-II⁺ APC oder CD45⁺ CD31⁺ Leukozyten (Abb. 3).

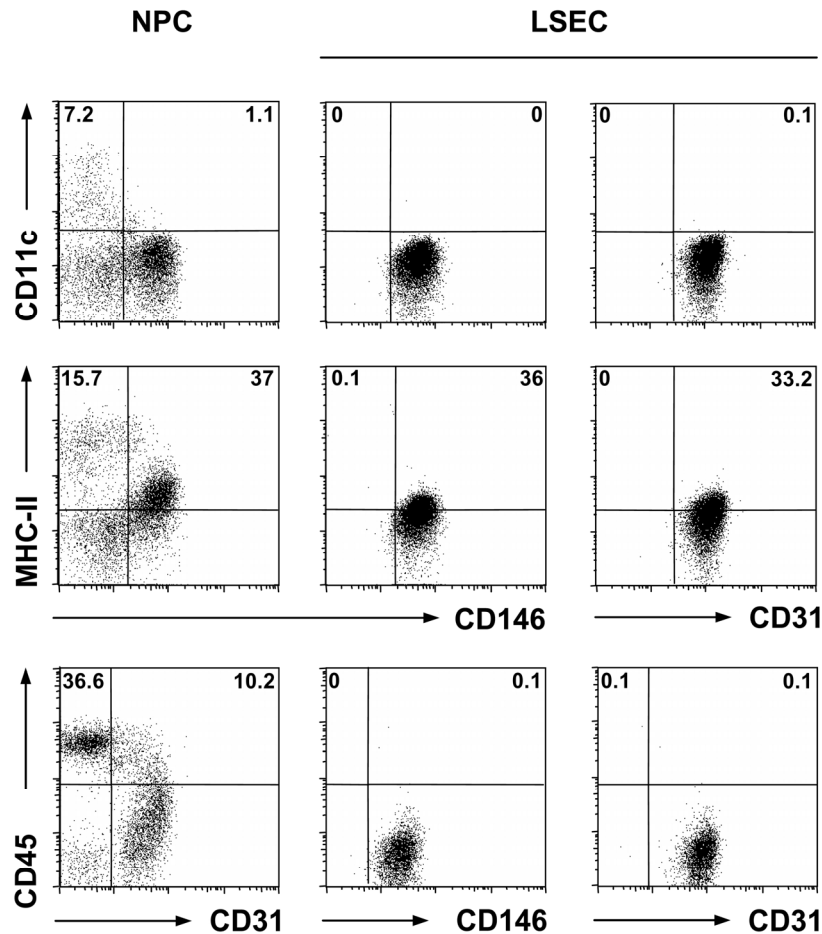


Abb. 3. Reinheit der verwendeten LSEC. NPC und über Nacht kultivierte LSEC wurden mit einem anti-CD11c, anti-MHC-II, anti-CD45, anti-CD146 oder anti-CD31 Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD11c⁺, MHC-II⁺ oder CD45⁺ NPC oder LSEC. Die *Dot Plots* sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.7.3 Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus Milz und Lymphknoten

Zur Isolation von CD4⁺ T-Zellen wurden die Milz und bestimmte Lymphknoten entnommen. Die Unterkiefer-, Hals- und Leistenlymphknoten sowie die Lymphknoten des Achsellymphzentrums wurden als periphere Lymphknoten (pLN) zusammengefasst. Die Lymphknoten des Darms wurden als mesenteriale Lymphknoten (mLN) bezeichnet. Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurden die Organe in PBS/BSA aufgenommen, mit einem Spritzenkolben durch ein Metallsieb gepresst und die Zellsuspension anschließend über ein Zellsieb (Porendurchmesser

70 μm) gegeben. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (350 g, 4°C, 8 min) wurden die darin enthaltenen Erythrozyten durch Inkubation mit dem Erythrozyten-Lyse-Medium für 5 min bei 4°C lysiert. Nach Waschen der Zellsuspension mit PBS/BSA erfolgte die Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer in Anwesenheit von Trypanblau. Die Einzelzellsuspensionen wurden mit einem anti-Fc γ -Rezeptor II/III Antikörper (20 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert.

In Adhäsions- und Transmigrationsassays verwendete CD4⁺ T-Zellen wurden durch Inkubation der Einzelzellsuspension mit anti-CD4 Microbeads und anschließender MACS isoliert. Die Reinheit der Zellen lag bei maximal 95 %.

Für die Generierung von Th1-Zellen wurde die Zellsuspension mit einem anti-CD4-FITC Antikörper inkubiert, gewaschen, mit anti-FITC Microbeads inkubiert und nochmals gewaschen. Nach der MACS lag die Reinheit bei maximal 99 %.

Zur Isolation von naiven CD4⁺ T-Zellen wurde ein weiterer Sortierungsschritt durchgeführt. Naive CD4⁺ T-Zellen exprimieren im Gegensatz zu Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen viel CD62L. Daher wurden naive CD4⁺ T-Zellen als CD4⁺CD62L^{high} T-Zellen definiert. Die Einzelzellsuspensionen wurden mit einem anti-CD4-FITC Antikörper und anschließend mit anti-FITC-MultisortBeads inkubiert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mittels MACS isoliert und mit einem Release Reagent in einer Zelldichte von $2,5 \times 10^7/\text{ml}$ für 10 min bei 4°C und 20 min bei RT in PBS/BSA behandelt, wodurch die Microbeads von den Antikörpern entfernt wurden. Durch erneute MACS wurden die Microbeads aus der Zellsuspension depletiert und diese mit anti-CD62L Microbeads inkubiert. Naive CD4⁺ CD62L^{high} T-Zellen wurden durch MACS mit einer Reinheit von maximal 99 % isoliert.

In *Homing*assays eingesetzte naive CD4⁺ T-Zellen wurden mittels eines CD4⁺ T-Zell-Isolationskits isoliert. Es wurden nur aus den pLN und mLN Einzelzellsuspensionen

hergestellt, um den Anteil an Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen so gering wie möglich zu halten. Die Zellsuspension wurde mit einem Gemisch aus biotinylierten Antikörpern (anti-CD8a, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-B220, anti-CD19, anti-DX5, anti-MHC-II, anti-CD105 und anti-Ter-119) für 10 min bei 4°C in PBS/BSA inkubiert. Anschließend wurden anti-Biotin Microbeads zugegeben und für 15 min bei 4°C in PBS/BSA inkubiert. Nach dem Waschen wurden die markierten Zellen mittels MACS depletiert. Die verbliebene Zellsuspension bestand zu maximal 90 % aus naiven CD4⁺ CD62L^{high} T-Zellen.

3.7.4 Isolation antigenpräsentierender Zellen aus Milz, mesenterialen oder peripheren Lymphknoten

Zur Isolierung von APC aus der Milz (*spleen-derived antigen presenting cells*, SAPC) wurden Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Diese wurden mit einem anti-Fcγ-Rezeptor II/III Antikörper (20 µg/ml) sowie anti-CD90.2 Microbeads inkubiert. CD90.2⁺ T-Zellen wurden mittels MACS vollständig depletiert. Als SAPC wurden CD90.2⁻ Milzzellen definiert.

Zur Isolation von DC aus mLN oder pLN wurden diese durch ein Metallsieb gepresst und im Verdaumedium II für 15 min bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Porendurchmesser 100 µm) gegeben und zweimal mit PBS/BSA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-Fcγ-Rezeptor II/III Antikörper (20 µg/ml) sowie anti-CD11c Microbeads inkubiert. Durch MACS wurden CD11c⁺ DC mit einer Reinheit von 60-80 % isoliert.

3.7.5 *In-vitro*-Aktivierung von LSEC

LSEC (5×10^6 /ml cDMEM) wurden in Anwesenheit der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) und $\text{IFN}\gamma$ (20 ng/ml) bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Nach 24 h Kultur wurden die Zellen mit Accutase für 5 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, von der Zellkulturplatte abgelöst und in PBS/BSA gewaschen. Anschließend wurden die LSEC hinsichtlich der Expression von MHC-II, kostimulatorischer- und Adhäsionsmoleküle am Durchflusszytometer untersucht.

3.7.6 *In-vitro*-Differenzierung antigenspezifischer oder polyklonaler T-Helferzellen

Bei der antigenspezifischen Generierung von Th1-Zellen wurden Ovalbumin (OVA)-TCR-transgene CD4^+ T-Zellen aus OT-II-Mäusen und SAPC aus WT-Mäusen isoliert und in einer Zelldichte von 1×10^6 /ml bzw. 2×10^6 /ml cRPMI in Anwesenheit des $\text{OVA}_{323-339}$ -Peptids (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), $\text{IFN}\gamma$ (20 ng/ml), IL-12 (5 ng/ml) und anti-IL-4 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 6 d bei 37°C und 5 % CO_2 kokultiviert. Am Ende der Kultur wurden die Zellen geerntet, mit PBS/BSA gewaschen und auf eine 17 %ige Nycodenzlösung geschichtet. Die Zentrifugation des Gradienten erfolgte bei 840 g für 10 min bei RT. Die in der Interphase enthaltenen vitalen Zellen wurden abgenommen und mit PBS/BSA gewaschen. Anschließend wurden die noch verbliebenen APC aus der Zellsuspension depletiert. Dazu wurden die Zellen mit einem anti-MHC-II-Cy5 Antikörper, gefolgt von anti-Cy5 Microbeads inkubiert. Die MHC-II^+ Zellen wurden über MACS vollständig depletiert.

Bei der Generierung von Th1-Zellen aus polyklonalen CD4^+ T-Zellen wurden diese aus WT-Mäusen isoliert und in einer Zelldichte von 1×10^6 /ml cRPMI in mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern (beide 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichteten Zellkulturplatten unter Th1-

polarisierenden Bedingungen für 6 d bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Vitale Zellen wurden mittels eines 17 %igen Nycodenzgradienten isoliert.

Die Qualität der generierten Th1-Zellen wurde durch Bestimmung der IFN γ -Expression untersucht, die bei über 60 % lag.

3.7.7 *In-vitro*-Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch verschiedene Populationen antigenpräsentierender Zellen

Zur Generierung von LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen (T_{LSEC}) wurden LSEC isoliert und in einer Zelldichte von 1x10⁶/ml cDMEM über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden alle nicht-adhärenenten Zellen abgewaschen. Die adhärenent wachsenden LSEC bildeten einen *Monolayer*. Auf diesem wurden 5x10⁵/ml cRPMI OVA-TCR-transgene, naive CD4⁺ CD62L^{high} T-Zellen in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids (5 µg/ml) für 6 d bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Generierung von SAPC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen erfolgte, indem 5x10⁵/ml cRPMI OVA-TCR-transgene, naive CD4⁺ CD62L^{high} T-Zellen mit 1x10⁶/ml cRPMI SAPC in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids (5 µg/ml) für 6 d bei 37°C und 5 % CO₂ kokultiviert wurden.

Für die Generierung von durch DC aus den mLN (mLN-DC) aktivierte CD4⁺ T-Zellen wurden mLN-DC isoliert und für 2 h mit dem OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (1,8 µg/ml) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA wurden 1x10⁵/ml cRPMI mLN-DC mit 2x10⁵/ml cRPMI OVA-TCR-transgenen, naiven CD4⁺ CD62L^{high} T-Zellen für 4 d bei 37°C und 5 % CO₂ kokultiviert.

Um den Einfluss von Vitamin A auf die Expression von *Homing*rezeptoren zu untersuchen, wurden T_{LSEC} durch LSEC aus Vit A⁻-Mäusen generiert. Ein Teil der Kulturen wurde in Anwesenheit von *all-trans*-Retinol (50 nM) durchgeführt.

Der Einfluss des Retinolsäure-*Signaling* wurden durch Kokulturen, in denen T_{LSEC} durch LSEC aus WT-Mäusen in Anwesenheit des Antagonisten des Retinolsäurerezeptors LE 540 (1 µM) (Iwata, et al., 2004) generiert wurden, analysiert. Am Ende der Kulturen wurden vitale Zellen geerntet und Phänotypanalysen durchgeführt. Vor der Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen mit Propidiumjodid (PI) versetzt.

3.7.8 *In-vitro*-Restimulierung von aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch verschiedene Populationen antigenpräsentierender Zellen

Um die Stabilität des Phänotyps von LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden T_{LSEC} generiert und in einer Zelldichte von 5x10⁵/ml cRPMI mit 1x10⁶/ml cRPMI SAPC oder LSEC in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids (5 µg/ml) für weitere 6 d bei 37°C und 5 % CO₂ kokultiviert.

Um den Einfluss der LSEC auf die Induktion eines Darm-*Homing*phänotyps bei Th1-Zellen zu analysieren, wurden OVA-spezifische Th1-Zellen generiert und noch vorhandene APC nach der Kultur mittels MACS depletiert. Anschließend wurden 5x10⁵/ml cRPMI Th1-Zellen mit 1x10⁶/ml cRPMI LSEC oder SAPC in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids (5 µg/ml) für weitere 3 d bei 37°C und 5 % CO₂ kokultiviert.

Vitale Zellen wurden über einen 17 %igen Nycodenzgradienten geerntet. Die Phänotypanalysen am Durchflusszytometer erfolgten nach Inkubation der Zellen mit PI.

3.8 Durchflusszytometrie

3.8.1 Analyse von Zellpopulationen

Mit fluorochromgekoppelten Antikörpern markierte Zellpopulationen wurden am Durchflusszytometer FACSCanto II analysiert. Das FACSCanto II besitzt drei Laser zur Anregung von Fluorochromen (violett: 405 nm, blau: 488 nm, rot: 633 nm) und ermöglicht eine simultane Detektion von 6 unterschiedlichen Fluoreszenzen. Zusätzlich zur Detektion des Fluoreszenzlichts werden das FSC- und das SSC-Signal der Zellen ermittelt.

Die gleichzeitige Analyse verschiedener Fluoreszenzen erfordert eine sorgfältige Kompensation, um spektrale Überlappungen zu vermeiden. Dazu wurden Einzelfärbungen mit den im Experiment verwendeten Fluorochromen durchgeführt und diese zusammen mit ungefärbten Zellen gemessen. Das detektierte Fluoreszenzsignal versus SSC-Signal wurden mittels der Diva Software als Zweiparameter-Punktdiagramm (*Dot Plot*) dargestellt und der Median der markierten Zellpopulation dem Median der unmarkierten Zellpopulation so angepasst, dass keine Emission in einem Fluoreszenzkanal als dem gewünschten mehr stattfand.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo (Tree Star Inc., Ashland OR, USA). Es wurden Fluoreszenz-minus-1 Proben gemessen, die alle Fluorochrome bis auf eins enthielten und dadurch unter Berücksichtigung des spektralen Hintergrunds der anderen Fluoreszenzen die korrekte Setzung des *Gates* für Zellen, markiert mit dem weggelassenen Fluorochrom, ermöglichten. Die Ergebnisse der Datenanalyse wurden entweder als geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität (GFI) des untersuchten Markers oder als % positiver Zellen für den Marker im Histogramm oder im *Dot Plot* dargestellt.

3.8.2 Nachweis von Oberflächenmolekülen

Die phänotypische Analyse von Zellen erfolgte mit Antikörpern, die gegen spezifische, von den Zielzellen exprimierte, Oberflächenmoleküle gerichtet sind und anschließender Durchflusszytometrie. Etwa 1×10^6 Zellen wurden in 100 μ l PBS/BSA aufgenommen und mit einem anti-Fc γ -Rezeptor II/III Antikörper (20 μ g/ml) sowie Antikörpern in vorher austitrierter Konzentration für 10 min bei 4°C inkubiert. Die meisten Antikörper waren direkt an Fluorochrome gekoppelt. Bei Biotin-gekoppelten Antikörpern erfolgte nach der ersten Inkubation eine zweite mit fluorochrommarkiertem Streptavidin. Für die Markierung von P-Lig wurde eine Maus P-Selektin/Mensch-IgG Fc-Chimäre eingesetzt. Da die Bindung der Chimäre Ca²⁺- und Mg²⁺-abhängig erfolgt, wurde die gesamte Prozedur mit calcium- und magnesiumhaltigen HBSS/BSA durchgeführt. Die Bindung von P-Lig wurde durch fluorochromgekoppeltes anti-Mensch IgG detektiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen in PBS/BSA oder HBSS/BSA entfernt. Die Zellen wurden bis zur Analyse am Durchflusszytometer bei 4°C aufbewahrt.

Die Analyse der Zellsuspensionen am Durchflusszytometer erfolgte in Anwesenheit von PI. PI ist eine fluoreszierende, nicht membranpermeable Substanz, welche lebende Zellen nicht markiert, jedoch in tote oder apoptotische Zellen eindringt und in die DNA interkaliert. Dadurch ist am Durchflusszytometer eine Unterscheidung zwischen PI⁻ lebenden und PI⁺ toten Zellen möglich.

3.8.3 Nachweis von intrazellulärem Interferon- γ

Von Th1-Zellen produzierte Zytokine wurden durch intrazelluläre Färbungen detektiert. Zur Stimulation der Zytokinproduktion wurden $2-5 \times 10^6$ Th1-Zellen in 1 ml cRPMI für 4 h mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) inkubiert. Nach 1 h wurde Brefeldin A

(10 µg/ml) zugegeben. Brefeldin A inhibiert den intrazellulären Transport von Proteinen und damit deren Sekretion. Nach der Inkubation wurden die Zellen in PBS/BSA gewaschen, mit einem anti-CD4 Antikörper für 10 min bei 4°C in PBS/BSA inkubiert und anschließend in 2 % PFA für 20 min bei RT fixiert. Dann wurden die Th1-Zellen in 1 ml Saponin-Puffer für 5 min permeabilisiert. Die intrazelluläre Färbung fand in 100 µl Saponin-Puffer, der neben einem anti-IFN γ Antikörper auch Ratten-IgG (10 µg/ml) enthielt, für 30 min bei RT statt. Nach erneutem Waschen im Saponin-Puffer wurden die Th1-Zellen in 0,5 %iger PFA-Lösung resuspendiert und bis zur Analyse am Durchflusszytometer bei 4°C aufbewahrt.

3.8.4 Analyse der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen

Um die Funktionalität verschiedener APC-Populationen zu untersuchen, wurden Proliferationsassays durchgeführt. Die Fähigkeit Antigene über MHC-II zu präsentieren wurde dabei indirekt durch die ausgelöste Proliferation von CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Die Proliferation von T-Zellen lässt sich durch deren Markierung mit CFSE untersuchen. CFSE wird bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, so dass der GFI von CFSE umso geringer, je höher die Generationszahl ist (Lyons and Parish, 1994).

OVA-TCR-transgene, naive CD4⁺ CD62L^{high} T-Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einer Zelldichte von 1x10⁷/ml PBS mit CFSE (5 µM) für 2 min 30 sec bei RT inkubiert. Durch Zugabe von cRPMI wurde die Reaktion abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in cRPMI wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer in Anwesenheit von Trypanblau bestimmt.

CFSE-markierte, naive CD4⁺ T-Zellen wurden mit LSEC oder SAPC in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids (5 µg/ml) für 6 d bei 37°C und 5 % CO₂ kokultiviert. Vitale Zellen

wurden mit einem anti-CD4 Antikörper markiert und am Durchflusszytometer hinsichtlich des GFI von CFSE analysiert.

3.8.5 Analyse der Internalisierung von Chemokinen in LSEC

LSEC (5×10^6 /ml cDMEM) wurden über Nacht kultiviert. Die adhären Zellen wurden sorgfältig mit cRPMI gewaschen und mit AlexaFluor 647-markiertem CXCL10 oder CXCL12 (beide 10 nM) für unterschiedliche Zeiträume bei 37°C oder 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit cRPMI gewaschen und anschließend durch Inkubation mit Accutase (5 min, 37°C, 5% CO₂) von den Kulturplatten abgelöst. Nach Waschen der Zellen in PBS/BSA wurden diese bis zur Analyse bei 4°C aufbewahrt und direkt vor der Messung mit PI versetzt.

Um den Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Chemokinaufnahme in LSEC zu untersuchen, wurden diese zunächst mit dem Clathrin-spezifischen Inhibitor CPZ (Wang, et al., 1993) (30 µM), den Caveolae-spezifischen Inhibitoren Nystatin oder Filipin (Rothberg, et al., 1990) (10 µM bzw. 15 µM) für 10 min oder dem spezifischen CXCR4-Antagonisten AMD 3100 (Donzella, et al., 1998; Schols, et al., 1997) (10 µM) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ vorbehandelt, gewaschen und anschließend für 1 h mit den Chemokinen bei 37°C inkubiert.

3.8.6 Analyse der enzymatischen Aktivität von Retinaldehydrogenasen

Zur Analyse der enzymatischen Aktivität von RALDH wurde ein ALDEFLUOR®-Assay durchgeführt (Yokota, et al., 2009). LSEC, mLN-DC oder pLN-DC (1×10^6 /ml) wurden für 30 min im ALDEFLUOR®-Assay-Puffer, der das ALDEFLUOR®-Substrat (BODIPY®-Aminoacetaldehyd) enthält, bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das membranpermeable

ALDEFLUOR®-Substrat wurde intrazellulär von Zellen, die funktionelle Aldehyddehydrogenasen exprimieren, in das nicht-membranpermeable, fluoreszierende BODIPY®-Aminoacetat umgesetzt. Die Kontrollgruppe wurde in Anwesenheit des RALDH-Inhibitors 4-Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) mit dem ALDEFLUOR®-Substrat inkubiert. ALDEFLUOR⁺ Zellen wurden am Durchflusszytometer detektiert.

3.9 Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene

3.9.1 Reverse Transkription und Standard-Polymerasekettenreaktion

Mittels reverser Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde die mRNA-Expression der vier bekannten RALDH-Isoformen in LSEC untersucht. FACS-isolierte LSEC sowie Gewebestücke der Leber und mLN wurden in RNAPure™ lysiert und die Gesamt-RNA durch Inkubation und Zentrifugation der Lysate in Chloroform und Isopropanol isoliert. Die RNA wurde einem DNase-Verdau unterzogen und die Konzentration am Nanodrop bestimmt. Dann wurden 0,5 µg RNA mittels des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits in *complementary* DNA (cDNA) revers transkribiert. Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt. Kontrollen wurden ohne Zugabe der MultiScribe™ Reversen Transcriptase generiert. Sie dienten bei der PCR dem Nachweis noch vorhandener genomischer DNA. Keine der Proben war mit genomischer DNA kontaminiert.

Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung der Taq DNA-Polymerase mit jeweils 25 ng cDNA für die Detektion von RALDH1, RALDH4 und GAPDH sowie mit 100 ng cDNA zum Nachweis von RALDH2 und RALDH3 durchgeführt. Folgendes PCR-Programm wurde zur Amplifikation verwendet:

Initialdenaturierung		5 min / 95°C
Amplifikation	Denaturierung	30 s / 95°C
	<i>Annealing</i>	45 s / 60°C
	<i>Extension</i>	90 s / 72°C

Nach 30 PCR-Zyklen erfolgte die finale Extension für 10 min bei 72°C und anschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Die PCR-Produkte wurden im Vergleich zu einer 100 Bp-DNA-Leiter als Größenstandard durch Gelelektrophorese in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (80 V, 1 h) und nach Inkubation der Gele in einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) mittels der Geldokumentationskamera BioVision visualisiert.

3.9.2 Quantitative TaqMan®-Polymerasekettenreaktion

Prinzip der TaqMan®-real-time-PCR

Mit der TaqMan®-*real-time*-PCR wurde die mRNA-Expression von Chemokinen im Lebergewebe quantifiziert. Dabei erfolgt die Detektion der Akkumulation der PCR-Produkte über fluorochrommarkierte, sequenzspezifische Oligonukleotide (Sonden). Diese binden in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA. Die Intensität des von den Fluorochromen emittierten Fluoreszenzlichts korreliert dabei mit der vorhandenen Menge an Ziel-DNA und kann über eine Software in Echtzeit (*real-time*) dargestellt werden (Gibson, et al., 1996; Higuchi, et al., 1993). Die Detektion der PCR-Produkte im PCR-System StepOnePlus™ erfolgte über einen TaqMan®-Sonden-basierten Assay. Dabei wurden Exon-übergreifende, sequenzspezifische *forward*- und *reverse*-Primer sowie eine Sonde, die an ihrem 5'Ende ein Fluorochrom und an ihrem 3'Ende einen Quencher trägt, verwendet. Aufgrund der unmittelbaren Nähe zwischen Fluorochrom und Quencher kommt es durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

zu einer starken Reduktion des emittierten Fluoreszenzlichts (Clegg, 1995). Wenn die Ziel-DNA in der Probe vorkommt, binden Primer und Sonde während der *Annealing*phase der PCR an die einzelsträngig vorliegende DNA. Aufgrund ihrer 5'Nukleaseaktivität baut die Taq DNA-Polymerase während der in 5'→3' Richtung erfolgenden DNA-Synthese die Sonde vom 5'Ende her ab. Dabei wird das Fluorochrom der Sonde freigesetzt, was durch eine erhöhte Fluoreszenzintensität detektiert wird. Der Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität mit jedem neuen PCR-Zyklus steht im direkten Verhältnis zur PCR-Produkt-Akkumulation. Über die Software wird die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl dargestellt. In Abhängigkeit von der vorhandenen Menge an Ziel-DNA unterscheiden sich in der Phase der exponentiellen Zunahme der PCR-Produkte nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale signifikant von den Hintergrundsignalen. Diese Schwelle wird von der Software als C_T -Wert definiert und für die relative Quantifizierung verwendet. Der C_T -Wert ist dabei umso kleiner, je höher die Menge an Ziel-DNA in der Probe ist.

Durchführung der TaqMan[®]-real-time-PCR

Die RNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgte wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Durch den Einsatz Exon-übergreifender Primer war hier ein DNase-Verdau der RNA nicht notwendig. Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des die Taq DNA-Polymerase enthaltenen Universal PCR Master Mix sowie den für jedes untersuchte Gen spezifischen TaqMan[®]-Primer/Sonden-Mix durchgeführt. Es wurden jeweils 100 ng cDNA, 100 ng des internen Standards oder *Aqua dest.* eingesetzt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Phase 1 2 min / 50°C
Phase 2 10 min / 95°C
Phase 3 15 s / 95°C
60 s / 60°C

Nach 40 Zyklen der Phase 3 wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

Generierung der internen Standards

Der interne Standard war ein Plasmid bekannter Konzentration, das die Sequenz der Ziel-DNA enthielt. Zur Generierung der Standards wurden über Standard-PCR und unter Verwendung der TaqMan®-Primer/Sonden-Mixe Amplifikate gewonnen, die mittels des TOPO® TA Cloning® Kits in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor kloniert wurden. Unter Verwendung des QIAprep® Miniprep Kits und des Plasmid Maxi Kits wurde die Plasmid-DNA aus den transformierten *Escherichia coli* (TOP10) aufgereinigt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation wurden Kontrollspaltungen mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt und die Spaltprodukte aufgetrennt und visualisiert. Die Sequenzierung wurde von der Firma SEQLAB Sequence Laboratories (Göttingen) durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen wurden mittels der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) überprüft. Bei Übereinstimmung der Sequenz des *Inserts* mit der Ziel-DNA wurden 100 µg Plasmid-DNA durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym BglII (200 U) linearisiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop. Aus dem über Sechsfachbestimmung ermittelten Mittelwert der DNA-Konzentration in g/μl ergab sich wie folgt die Konzentrationsangabe in Moleküle/μl:

$$X = \frac{\text{Anzahl der bp (Vektor + Insert)} \times \text{molare Masse pro bp (g} \times \text{mol}^{-1})}{\text{Avogadro-Konstante } N_A (\text{mol}^{-1})} = \text{g/Molekül}$$

$$Y = \frac{\text{Konzentration der DNA (g} \times \mu\text{l}^{-1})}{X (\text{g} \times \text{Molekül}^{-1})} = \text{Molekül}/\mu\text{l}$$

Die Avogadro-Konstante gibt die Zahl der Teilchen in einem Mol an und hat einen Wert von $6,02 \times 10^{23}/\text{mol}$. Die molare Masse pro bp liegt bei 600 g/mol.

Es wurde eine Titration des linearisierten Standards von 1×10^{10} - 1×10^2 Molekülen/μl in jeder PCR-Reaktion durchgeführt und die ermittelten C_T -Werte mit den eingesetzten Konzentrationen korreliert. Bei einem linearen Verlauf der Titrationskurve und einem $R^2 \geq 0,99$ (Abb. 4) wurde den ermittelten C_T -Werten der Ziel-DNA eine Konzentration zugeordnet. Die Konzentration der Ziel-DNA wurde ins Verhältnis zur Konzentration der Referenz-DNA gesetzt und als relative Expression angegeben.

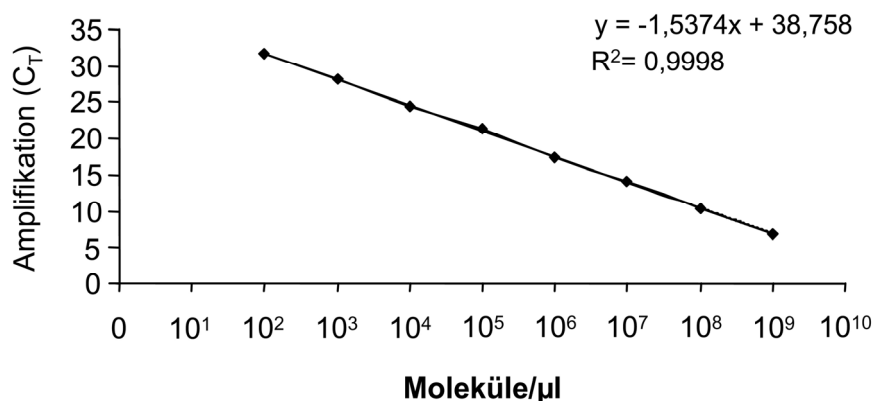


Abb. 4. Titrationskurve eines CXCL9-Standards bei der TaqMan®-real-time-PCR. Eine spezifische Sequenz des CXCL9 wurde mittels des TaqMan® Primer/Sonden-Mixes amplifiziert, in einen Plasmid-Vektor ligiert und vervielfältigt. Die DNA-Konzentration wurde in Moleküle/μl errechnet und die linearisierte Plasmid-DNA mit der enthaltenen CXCL9-Sequenz wurde als Standard bei der TaqMan®-real-time-PCR verwendet. Bei einer Titrationskurve wurden 1×10^2 bis 1×10^{10} Moleküle/μl eingesetzt und die Konzentrationen im Verhältnis zu den entsprechenden C_T -Werten dargestellt.

Normalisierung der Ergebnisse

Die Ergebnisse einer TaqMan[®]-*real-time*-PCR werden durch Faktoren wie Unterschiede in der Ausgangsmenge an RNA sowie in der reversen Transkription und den PCR-Effizienzen beeinflusst, weshalb für eine Quantifizierung die Korrektur dieser Faktoren notwendig ist. Dabei erfolgt eine Normalisierung der Expression des Zielgens zur Expression eines Referenzgens und die ermittelten Werte des Zielgens werden relativ zum Referenzgen angegeben. Die Expressionshöhe eines Referenzgens sollte in verschiedenen Zellpopulationen konstant sein, nicht reguliert werden und nicht unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen variieren.

In dieser Arbeit wurde als Referenz das Haushaltsgen GAPDH gewählt. In eigenen Vorversuchen wurde gezeigt, dass unter den verwendeten experimentellen Bedingungen sowie Zellpopulationen und Geweben die Expressionshöhe von GAPDH immer konstant war.

3.9.3 Western Blot

Der Western Blot wurde als Verfahren zum Nachweis des RALDH1-Proteins in LSEC eingesetzt. Dazu wurden LSEC und Lebergewebe im Immunpräzipitationspuffer lysiert und die Proteingemische zusammen mit einem Proteinmarker mittels *sodium dodecyl sulphate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die SDS-PAGE ist ein denaturierendes Verfahren, bei dem durch SDS die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört und diese mit einer einheitlichen negativen Ladung belegt werden. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte anhand der Größe der Polypeptidketten (Laemmli, 1970) im 12 %igen Polyacrylamidgel (150 V, 90 min). Dann erfolgte in einer Elektrophoresekammer der Transfer der Proteinbanden auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran. Dabei wurde in einem als *Blotting* bezeichneten

Vorgang durch Anlegen einer Spannung (250 mA, 55 min) senkrecht zur Laufrichtung des Gels das Wandern der Proteinbanden aus dem Gel in Richtung Membran und eine Bindung an die Membran erreicht. Die auf der Membran immobilisierten Proteine konnten dann durch Markierung mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Die Membranen wurden mit einem Kaninchen anti-Maus RALDH1 oder einem Maus anti- β -Actin Primärantikörper über Nacht bei 4°C im Blockierungspuffer inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen im Blockierungspuffer erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper für 1 h bei RT im Blockierungspuffer. Anschließend wurde die Antikörperbindung mittels Inkubation der Membranen im Amersham™ ECL Western Blotting Detection Reagents über Chemilumineszenz im ECL™ System detektiert.

3.10 Analyse von T-Zellfunktionen

3.10.1 Adhäsion

Um die Adhäsion von CD4⁺ T-Zellen an LSEC zu untersuchen, wurden Adhäsionsassays durchgeführt. LSEC (5x10⁶/ml cDMEM) wurden über Nacht in An- oder Abwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids (5 µg/ml) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Teil der LSEC wurde durch Zugabe von TNF α (10 ng/ml) und IFN γ (20 ng/ml) aktiviert. Am nächsten Tag wurden alle nicht-adhärenenten Zellen sorgfältig gewaschen und am Mikroskop überprüft, ob die LSEC einen *Monolayer* gebildet hatten. OVA-TCR-transgene und WT-CD4⁺ T-Zellen wurden isoliert und mit Calcein AM (5 µg/ml) in einer Zelldichte von 1x10⁷/ml cRPMI ohne FCS für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit cRPMI gewaschen und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die toten Zellen

entfernt und jeweils 1×10^6 Calcein-markierte $CD4^+$ T-Zellen auf die LSEC gegeben und für 1 h in cRPMI bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden 2/3 des Mediums abgenommen und die Zellen zweimal für 10 min in 30 %iger Nycodenzlösung bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Dadurch lösten sich die nicht an das Endothel adhären Zellen vom Plattenboden und konnten mit dem Nycodenz entfernt werden. Es wurde, ohne den Plattenboden zu berühren, jeweils 2/3 des Mediums abgenommen. Nach zweimaligem Waschen der Platten mit PBS/BSA wurde die Fluoreszenzintensität von Calcein mit einem Spectrofluorometer gemessen. Die detektierte Fluoreszenzintensität wurde ins Verhältnis zur Fluoreszenzintensität der Ausgangszellzahl gesetzt und als % adhärenter $CD4^+$ T-Zellen vom *Input* angegeben.

3.10.2 Transmigration

Kultivierung von LSEC auf Transwell®-Filtereinsätzen

Mittels Transmigrationsassays wurde die antigen- und chemokinabhängige transendotheliale Migration von $CD4^+$ T-Zellen durch einen LSEC-Monolayer untersucht. Dazu wurde das Transwell®-System, bestehend aus 24-Well-Platten mit Transwell®-Einsätzen, deren Boden aus einer Polycarbonatmembran mit 5 μm Porendurchmesser besteht, verwendet.

LSEC ($5 \times 10^6/\text{ml}$ cDMEM) wurden auf Transwell®-Filtereinsätzen bei 37°C und 5 % CO_2 über Nacht kultiviert. Zur Überprüfung der Ausbildung des endothelialen *Monolayer* wurden die Transwell®-Einsätze am Ende des Versuchs für 2 h über 37 %iger Formaldehydlösung fixiert und für 10 min mit 2,6 %iger Giemsa-Lösung gefärbt. Dann wurden die Membranen von den Einsätzen abgelöst und auf Objektträgern in Entellan® eingebettet. Die Ausbildung der *Monolayer* wurde am Axiolmager Z1 Mikroskop überprüft.

Durchführung der Transmigrationsassays

CD4⁺ T-Zellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^6 /ml im Migrationsmedium resuspendiert und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die auf den Transwell®-Einsätzen kultivierten LSEC gründlich mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Danach wurden 5×10^5 CD4⁺ T-Zellen in die obere Transwell®-Kammer gegeben und 600 µl Migrationsmedium in die untere Transwell®-Kammer pipettiert. Nach 90 min Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden 500 µl Migrationsmedium aus der unteren Transwell®-Kammer entnommen und die Anzahl der transmigrierten Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Vor der Messung wurden die Zellen mit PI versetzt.

Bei der Untersuchung der antigenabhängigen Transmigration wurden die LSEC in An- oder Abwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids (5 µg/ml) kultiviert. Ein Teil der LSEC wurde durch Zugabe von TNFα (10 ng/ml) und IFNγ (20 ng/ml) aktiviert. Vor der Zugabe der OVA-TCR-transgenen oder WT-CD4⁺ T-Zellen wurden die LSEC gewaschen.

Bei der Analyse der chemokinabhängigen Transmigration wurden die LSEC vor der Zugabe der WT-CD4⁺ T-Zellen für 2 h mit den Chemokinen CXCL9, CXCL10 (beide 100 nM) oder CXCL12 (50 nM), zugegeben in die untere Transwell®-Kammer, bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Entfernung der Chemokine aus der unteren Transwell®-Kammer fanden die Transmigrationsassays wie beschrieben statt. Ein Teil der LSEC wurde vor der Chemokininkubation mit in die untere Transwell®-Kammer zugegebenem CPZ (30 µM) für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ behandelt und anschließend mit PBS gewaschen. In einem weiteren Ansatz wurden LSEC vor der Chemokininkubation mit den Enzymen Heparinase I oder Chondroitinase (beide 1 U/ml), zugegeben in die obere Transwell®-Kammer, für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und vor den Transmigrationsassays gewaschen.

Quantifizierung der transmigrierten CD4⁺ T-Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Fluoresbrite™ Microspheres als Zählbeads verwendet. Die Konzentration der Zählbeads wurde durch Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und definierte Volumina zu den Proben gegeben. Es wurden 500 µl von 600 µl des Migrationsmediums aus der unteren Transwell®-Kammer entnommen und mit 10 µl Zählbeads versetzt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen auf den Zellen mit einem anti-Fcγ-Rezeptor II/III Antikörper (20 µg/ml) geblockt und die Zellen mit einem anti-CD45RB und einem anti-CD4 Antikörper für 20 min bei 4°C inkubiert. Ohne Waschen der Zellen erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer, wobei pro Probe 5000 Zählbeads gezählt wurden.

Aufgrund ihrer Größe und Fluoreszenz konnten die Zählbeads von den zu analysierenden Zellen unterschieden werden, was eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der Events im CD4-Gate und der Anzahl der Events im Zählbead-Gate ermöglichte (Abb. 5).

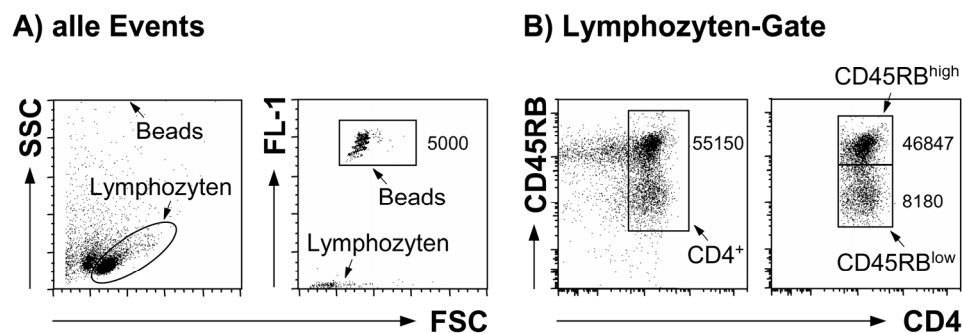


Abb. 5. Bestimmung der Zellzahl am Durchflusszytometer mittels Fluorescent™ Microspheres. Die zu analysierenden Zellen wurden über das FSC- und SSC-Signal (A) und die fluorochrommarkierten anti-CD4 und anti-CD45RB Antikörper (B) definiert. In (A) ist außerdem das Signal für die Fluoresbrite™ Microspheres dargestellt, deren Fluoreszenz im FL-1-Kanal detektiert wird. Sowohl um die Zellen als auch im die Zählbeads wurden Gates gelegt, um die Anzahl der in den Gates enthaltenen Events (Zahlen in den Dot Plots) zu ermitteln.

Die Anzahl transmigrierter CD4⁺ T-Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$c_{CD4} = 6/5 \times n_{CD4} / n_{Zählbeads} \times c_{Zählbeads}$$

n_{CD4} = Anzahl der Events im CD4-*Gate*, ermittelt am Durchflusszytometer

$n_{Zählbeads}$ = Anzahl der Events im Zählbead-*Gate*, ermittelt am Durchflusszytometer

$c_{Zählbeads}$ = Konzentration der eingesetzten Zählbeads, ermittelt in Zählkammer

c_{CD4} = Konzentration transmigrierter CD4⁺ T-Zellen, ermittelt mittels Zählbeads

Die ermittelte Zellzahl wurde ins Verhältnis zur Ausgangszellzahl gesetzt und als % transmigrierte CD4⁺ T-Zellen vom *Input* dargestellt.

3.10.3 *In-vivo*-Migration von CD4⁺ T-Zellen

Um die Migration von CD4⁺ T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden *Homingassays* durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in einer Zelldichte von 2×10^7 /ml cRPMI mit ⁵¹Chrom (20 µCi/ml) für 1 h bei 37°C radioaktiv markiert. Nach zweimaligem Waschen mit cRPMI wurden die Zellen für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend die toten Zellen mittels eines 17 %igen Nycodenzgradienten entfernt.

Die radioaktiv markierten Zellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^5 - 2×10^6 /200 µl PBS intravenös (i.v.) in die Mäuse gespritzt. Die in bestimmten Organen, Blut und dem Restkörper enthaltene Radioaktivität wurde mittels eines WIZARD® Gamma-Counters gemessen. Dabei reflektierte der angegebene Prozentsatz organspezifischer Radioaktivität im Verhältnis zur gesamten detektierten Radioaktivität den prozentualen Anteil von CD4⁺ T-Zellen, die in das entsprechende Organ migriert waren.

3.11 Mikroskopie

3.11.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Detektion und Lokalisation von durch LSEC aufgenommenem CXCL12 und endogenem Clathrin oder Caveolae erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Dazu wurden auf Transwell®-Einsätzen kultivierte LSEC für unterschiedliche Zeiträume mit in der unteren Kammer vorhandenem CXCL12-AlexaFluor 647 (50 nM) in cRPMI bei 37°C und 5% CO₂ oder 4°C inkubiert. Dann wurden die LSEC in PBS gewaschen und mit 2 % PFA fixiert. Die Membranen wurden von den Einsätzen abgelöst und auf Objektträgern aufgebracht. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Bilder wurden mit einem LSM 510 META Laser-Scanning-Mikroskop generiert.

Bei einem Teil der Ansätze erfolgte eine Vorbehandlung der LSEC mit in der unteren Transwell®-Kammer vorhandenem CPZ (30 µM), Nystatin (10 µM) oder Filipin (15 µM) für 10 min bzw. AMD 3100 (10 µM) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach sorgfältigem Waschen der LSEC wurden diese für 1 h mit CXCL12-AlexaFluor 647 (50 nM) inkubiert.

Bei der Kolokalisationsanalyse wurden die LSEC für 10 min mit in der unteren Kammer vorhandenem CXCL12-AlexaFluor 647 inkubiert. Nach der Fixierung der Zellen wurden die Membranen mit einem Maus anti-Maus Clathrin oder Maus anti-Maus Caveolae Primärantikörper für 30 min bei RT, gefolgt von einem AlexaFluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG Sekundärantikörper inkubiert. Negativkontrollen wurden durch Weglassen des Primärantikörpers durchgeführt.

3.11.2 *In-situ*-Nachweis von T-Zellen im Lebergewebe der Maus

Um CD3⁺ T-Zellen *in situ* im Lebergewebe nachzuweisen wurde dieses in 4 % PFA über Nacht fixiert und in Paraffin eingebettet. Am Microm HM 325 wurden 2 µm Paraffinschnitte angefertigt, welche durch Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert wurden. Da bei der Fixierung Quervernetzungen zwischen verschiedenen Gewebeantigenen entstehen, wurde ein *Antigen-Retrieval* durch Kochen der Schnitte durchgeführt.

Zur Quantifizierung der T-Zellinfiltrate wurden die Gewebeschnitte mit einem Kaninchen anti-Maus CD3 Primärantikörper für 30 min bei RT inkubiert, gefolgt von einem biotinylierten Ziege anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper aus dem Streptavin/Alkalische Phosphatase Kit. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte mit dem Streptavidin/Alkalische Phosphatasekomplex für 30 min bei RT inkubiert. Zur Farbentwicklung wurde das Chromogen Neufuchsin (Fast Red) eingesetzt, dass einen roten, unlöslichen Farbkomplex bildete. Negativkontrollen wurden durch Färbungen der Schnitte ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Schnitte wurden weiterhin einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen, wodurch die Zellkerne durch die Hämalaunlösung blau/violett und das Zytoplasma durch das Eosin rosa gefärbt wurden.

Die Bilder wurden mittels eines AxioImager Z1 Mikroskop generiert sowie mit der Axiovision Software (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen) prozessiert. Es wurden alle CD3⁺ T-Zellen pro Gesichtsfeld (*high power field*, HPF) und 3 HPF pro Leberprobe geblindet ausgezählt. Der Mittelwert wurde als CD3⁺/HPF angegeben.

3.11.3 *In-situ*-Nachweis von CXCL9 im Lebergewebe der Maus

Um die Expression des Chemokins CXCL9 im Lebergewebe nachzuweisen, wurde dieses schockgefroren und bei -80°C gelagert. 4 µm Gefrierschnitte wurden mit einem Ratte anti-Maus CD146 Primärantikörper für 30 min bei RT inkubiert, gefolgt von einem AlexaFluor 488-konjugiertem Esel anti-Ratte IgG Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit einem Kaninchen anti-Maus CXCL9 Primärantikörper und einem AlexaFluor 555-markiertem Esel anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper für jeweils 30 min inkubiert. Bei Negativkontrollen entfiel die Inkubation mit dem Primärantikörper. Abschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Bilder wurden mittels eines AxioImager Z1 Mikroskop generiert sowie mit der Axiovision Software prozessiert.

3.12 Maus- und Krankheitsmodelle

3.12.1 Generierung von Knochenmarkchimären der Maus

Knochenmarkchimären wurden generiert, um eine auf LSEC beschränkte Antigenpräsentation zu erreichen und den Einfluss dieser auf die Migration antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen.

Zur Generierung von Knochenmarkchimären wurden als Rezipienten WT-Mäuse oder TF-OVA-Mäuse mit 10,4 Gy im Gammacell® 40 Exactor letal bestrahlt. Am nächsten Tag wurde MHC-II^{-/-}-Spendertieren Knochenmark aus *Femur* und *Tibia* der beiden hinteren Extremitäten entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Aus diesen wurden die CD90⁺ T-Zellen mittels MACS depletiert. Je 5x10⁶ Knochenmarkzellen in 200 µl PBS wurden i.v. in die Rezipienten gespritzt (Abb. 6). Durch die Rekonstitution mit den Knochenmarkzellen der MHC-II^{-/-}-Donoren bildeten die Rezipienten

hämatopoetische APC, die kein MHC-II exprimierten, während nicht-hämatopoetische APC, zu denen vor allem LSEC gehören, weiterhin MHC-II exprimierten (Abb. 6).

Bei der Etablierung des Modells wurde der Anteil MHC-II-exprimierender Zellen in Milz und Leber der Knochenmarkchimären überprüft. Es wurde die Depletion MHC-II⁺ hämatopoetischer Zellen in beiden Organen nachgewiesen. Ferner wurde gezeigt, dass in der Leber die nicht-hämatopoetischen LSEC weiterhin MHC-II exprimierten (Kruse, et al., 2009).

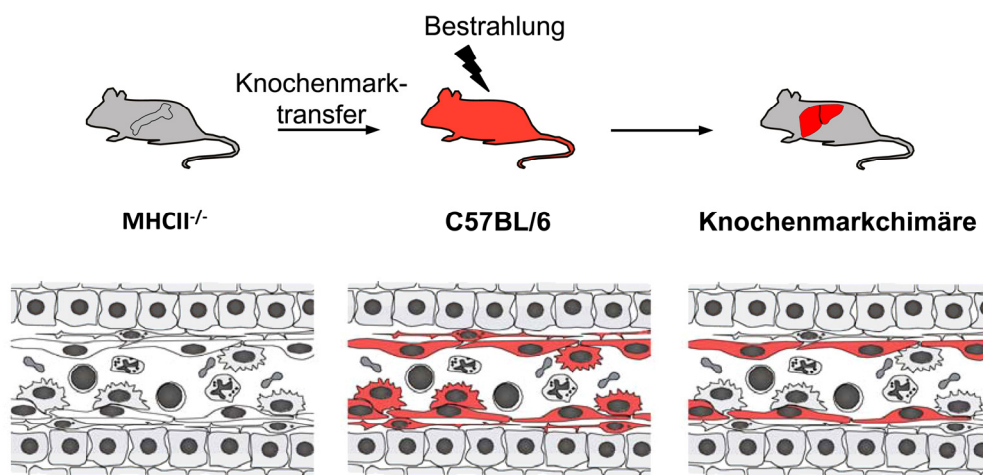


Abb. 6. Generierung von Knochenmarkchimären. WT-Mäuse wurden letal bestrahlt und erhielten am nächsten Tag i.v. Knochenmarkszellen aus MHC-II^{-/-}-Mäusen. Durch die Rekonstitution von WT-Mäusen, in denen Antigene über MHC-II ubiquitär präsentiert werden, mit Knochenmarkszellen aus MHC-II^{-/-}-Mäusen, die kein MHC-II exprimieren, wurden Knochenmarkchimären generiert, in denen die Antigenpräsentation mittels MHC-II auf nicht-hämatopoetische APC, vor allem LSEC, beschränkt war. Rot markiert bei den Mäusen den Ort der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation und bei den Querschnitten der Sinusoide die APC-Populationen der Leber, die MHC-II exprimieren.

Tabelle 8 zeigt die generierten Chimärenkombinationen.

Tab. 8: Kombinationen von Knochenmarkchimären

Donoren	Rezipienten	Chimärenkombination	Antigenpräsentation
MHC-II ^{-/-}	WT	MHC-II ^{-/-} → WT	nicht-hämatopoetische
MHC-II ^{-/-}	TF-OVA	MHC-II ^{-/-} → TF-OVA	APC, vor allem LSEC
WT	WT	WT → WT	ubiquitär

Die Rezipienten wurden ab einer Woche vor der Bestrahlung und bis zu vier Wochen nach dem Transfer von Knochenmarkzellen mit 0,4 % Baytril® als Antiinfektivum im Trinkwasser behandelt.

Um die Depletion endogener Zellen und die Rekonstitution mit MHC-II^{-/-}-Zellen zu überprüfen, wurde 6 Wochen nach Generierung der Knochenmarkchimären der Anteil MHC-II⁺ Zellen im Blut bestimmt. Das Blut wurde über die Schwanzvene entnommen, mit Heparin versetzt und mit PBS/BSA verdünnt. Dann wurde es mit anti-MHC-II und anti-CD4 Antikörpern für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit Novalyse bei RT inkubiert, mit *Aqua dest.* versetzt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden in den MHC-II^{-/-} → WT- oder MHC-II^{-/-} → TF-OVA-Chimären 0,4 ± 0,3 % bzw. 0,4 ± 0,2 % MHC-II⁺ Zellen nachgewiesen, während in den WT → WT-Chimären der Anteil MHC-II⁺ Zellen vergleichbar mit dem in WT-Mäusen war (Abb. 7).

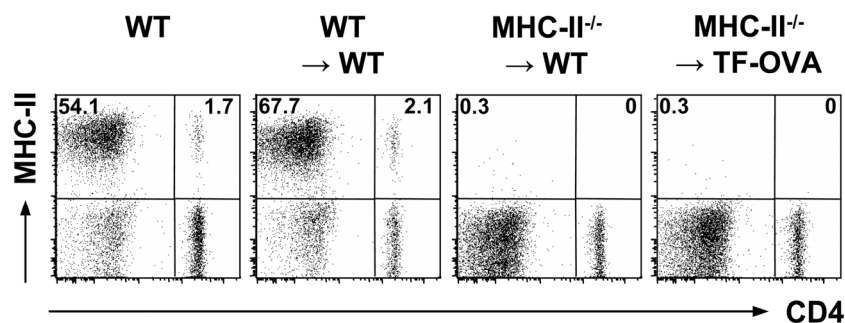


Abb. 7. Anteil MHC-II⁺ Zellen in den verschiedenen Knochenmarkchimären. Sechs Wochen nach Transfer von Knochenmarkzellen aus MHC-II^{-/-}-Spendertieren wurde den Rezipienten über die Schwanzvene Blut entnommen, mit anti-MHC-II und anti-CD4 Antikörpern inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die *Dot Plots* zeigen repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit 3-4 Tieren pro Gruppe.

3.12.2 Concanavalin A-induzierte Autoimmunhepatitis

Das Modell der Concanavalin (Con) A-induzierten T-Zell-vermittelten Hepatitis wurde für Untersuchungen der Rekrutierung von T-Zellen unter entzündlichen Bedingungen in die Leber verwendet. Die Gabe des Lektins Con A führt zur mitogenen Aktivierung endogener T-Zellen, zur Expression proinflammatorischer Zytokine, zum Einwandern von Leukozyten in das Lebergewebe und zur Apoptose von Hepatozyten. Es wurden CD4⁺ T-Zellen, NKT-Zellen und Makrophagen als Effektorzellen in der Con A-induzierten Autoimmunhepatitis (AIH) identifiziert (Gantner, et al., 1995; Lis and Sharon, 1986; Takeda, et al., 2000; Tiegs, et al., 1992).

Zur Induktion der AIH wurde WT-Mäusen i.v. Con A (20 mg/kg in PBS) gespritzt. Die Gabe von Con A führte zu einem transienten Anstieg der Alanin-Transaminase (ALT)-Aktivität im Plasma von WT-Mäusen, der 8 h bis 12 h nach Con A-Gabe sein Maximum erreichte (Abb. 8). Zur Bestimmung der ALT-Aktivität wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene entnommen und in mit Heparin beschichteten Gefäßen zur Plasmagewinnung mit Trenngel überführt. Durch Zentrifugation (6200 g, 10 min, RT) wurden die Blutzellen vom Plasma durch das Trenngel abgetrennt. Das Plasma wurde bei -20°C aufbewahrt. Die ALT-Aktivität wurde durch automatisierte Messungen eines Roche Modular Analyzers im Institut für Klinische Physiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin ermittelt.

Für Analysen bezüglich des Einflusses eines Clathrin-Inhibitors auf den Verlauf der Con A-induzierten AIH wurde CPZ (3 mg/kg in PBS) 1 h nach Gabe von Con A intraperitoneal (i.p.) verabreicht.

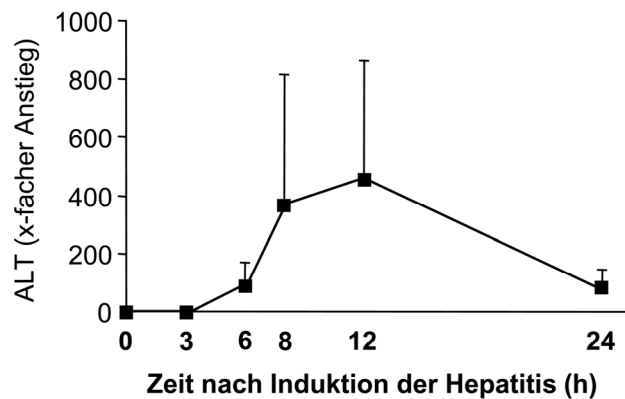


Abb. 8. ALT-Aktivitäten im Plasma von C57BL/6-Mäusen nach i.v. Gabe von Con A. C57BL/6-Mäusen wurde i.v. Con A gespritzt und zu den angegebenen Zeitpunkten Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Abbildung zeigt den x-fachen Anstieg der ALT-Aktivitäten im Plasma Con A-behandelter Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. MW \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-5 Tieren.

Zur Bewertung des Ausmaßes einer AIH wurden histologische Analysen durchgeführt. Dazu wurde Lebergewebe aus WT-Mäusen entnommen, in 4 % PFA über Nacht fixiert und in Paraffin eingebettet. Am Microm HM 325 wurden 2 μ m Paraffinschnitte angefertigt, welche durch Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert wurden. Die Schnitte wurden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Die Bilder wurden mittels eines AxioImager Z1 Mikroskop generiert sowie mit der Axiovision Software prozessiert. Der Score nach Siegmund *et al.* (Siegmund, et al., 2002) wurde geblindet ermittelt, wobei sowohl die Anzahl und Größe der nekrotischen Bereiche als auch die Zellinfiltration berücksichtigt wurden.

3.13 Statistische Datenanalyse

Die Daten wurden mit den Programmen GaphPad Prism 5 oder Excel (Microsoft) ausgewertet und die Graphen mit GaphPad Prism 5 generiert. Für die statistische Auswertung wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test oder der *One-Sample* t-Test mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Rekrutierung von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen in das Lebergewebe mittels Antigenpräsentation durch LSEC

LSEC sind nicht-professionelle APC der Leber, die CD4⁺ T-Zellen Antigene mittels MHC-II präsentieren. Welchen Einfluss diese endotheliale Antigenpräsentation auf die organspezifische Migration antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen und damit auf den Verlauf von Immunantworten hat, ist nicht bekannt. Daher wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, inwieweit eine Antigenpräsentation durch das Lebersinusendothel die Migration von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen beeinflusst.

4.1.1 Adhäsion und Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch LSEC-Monolayer unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen

Die Adhäsion von CD4⁺ T-Zellen an LSEC und die Transmigration durch das Endothel wurden mit Hilfe von Adhäsions- und Transmigrationsassays *in vitro* untersucht. Von besonderem Interesse war, ob entzündliche Bedingungen allein ausreichend für die Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel sind und inwieweit eine gleichzeitige Stimulierung des TCR mittels Antigenpräsentation durch LSEC die Adhäsion und Transmigration antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen beeinflusst.

Es wurde der Phänotyp von aktivierten und nicht-aktivierten LSEC untersucht und die Expression der für die Adhäsion erforderlichen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie der für die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung notwendigen MHC-II- und CD80-Moleküle analysiert. Dazu wurden LSEC in An- oder Abwesenheit der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ über Nacht kultiviert. Nicht-aktivierte

LSEC exprimierten konstitutiv ICAM-1, VCAM-1, MHC-II und CD80. Die Kultivierung des Endothels in Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ bewirkte eine signifikant erhöhte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und MHC-II, während die Expression von CD80 nicht verändert war (Abb. 9A).

In funktionellen Assays wurden zytokinaktivierte oder nicht-aktivierte LSEC-Monolayer zusätzlich in An- oder Abwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids kultiviert und die Adhäsion und Transmigration von OVA-spezifischen CD4^+ T-Zellen untersucht.

Die Adhäsion von CD4^+ T-Zellen an das nicht-aktivierte Endothel wurde durch Aktivierung der LSEC nicht signifikant erhöht und auch die Transmigration von CD4^+ T-Zellen durch zytokinaktivierte LSEC-Monolayer war nicht verändert (Abb. 9B, C). Die Präsentation des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids durch nicht-aktivierte LSEC führte im Vergleich zum Endothel, das kein Antigen präsentierte, weder zu einer verstärkten Adhäsion noch Transmigration von OVA-spezifischen CD4^+ T-Zellen (Abb. 9B, C). Die Antigenpräsentation durch zytokinaktiviertes Lebersinusendothel hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion (ohne Antigen: $15,6 \pm 4,1$ %; mit Antigen: $13,8 \pm 8,3$ %; MW \pm SD; n = 4) oder Transmigration (ohne Antigen: $1,5 \pm 0,5$ %; mit Antigen: $1,4 \pm 0,5$ %; MW \pm SD; n = 4) von WT- CD4^+ T-Zellen. Dagegen war die Adhäsion von OVA-spezifischen CD4^+ T-Zellen an aktivierte LSEC sowie die Transmigration der CD4^+ T-Zellen durch aktivierte LSEC-Monolayer signifikant erhöht (Abb. 9B, C).

Die Ergebnisse zeigen, dass weder die Aktivierung des Lebersinusendothels durch proinflammatorische Zytokine noch die Antigenpräsentation durch nicht-aktivierte LSEC allein einen Einfluss auf die Adhäsion und Transmigration von CD4^+ T-Zellen hatten. Im Gegensatz dazu führte die Antigenpräsentation durch aktivierte LSEC zu einer erhöhten Adhäsion und transendothelialen Migration von antigenspezifischen CD4^+ T-Zellen.

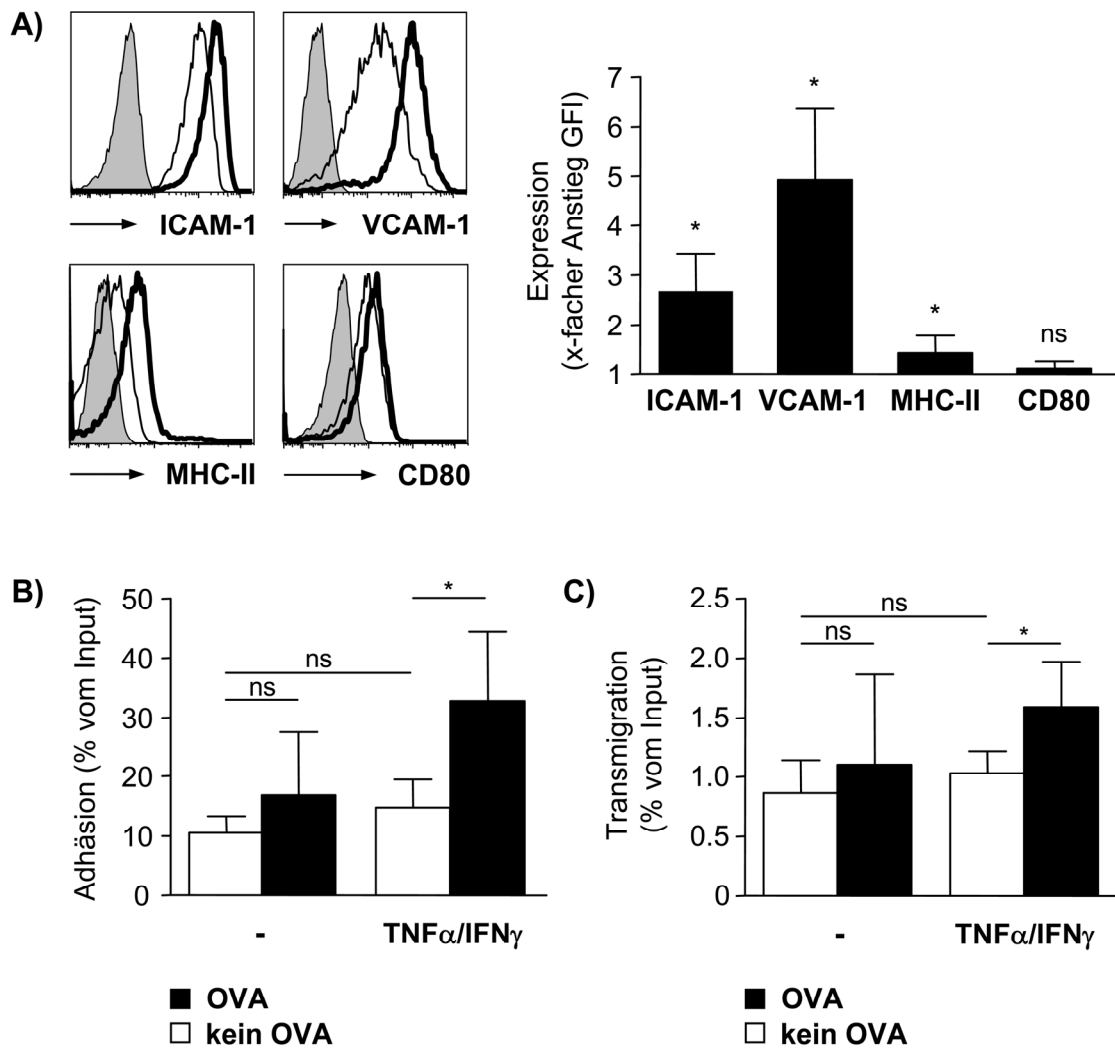


Abb. 9. Phänotypanalyse zytokinaktivierter und nicht-aktivierter LSEC sowie aktivierungs- und antigenabhängige Adhäsion und Transmigration von CD4⁺ T-Zellen. LSEC aus C57BL/6-Tieren wurden in An- oder Abwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids sowie TNFα und IFNγ kultiviert. (A) LSEC wurden mit einem anti-ICAM-1, anti-VCAM-1, anti-MHC-II oder anti-CD80 Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, unmarkierte LSEC; schmale Linie, nicht-aktivierte LSEC; verstärkte Linie, zytokinaktivierte LSEC. Das Diagramm zeigt MW ± SD des x-fachen Anstiegs des geometrischen Mittelwerts der Fluoreszenzintensität (GFI) aktivierter LSEC im Verhältnis zur GFI nicht-aktivierter LSEC von 4 unabhängigen Experimenten. * = p < 0,05; *One-Sample* t-Test. (B) Auf Zellkulturplatten adhären LSEC-Monolayer wurden für 1 h mit Calcein-markierten CD4⁺ T-Zellen aus OT-II-Mäusen inkubiert. Die Fluoreszenzintensität adhären CD4⁺ T-Zellen wurde mittels eines Spectrofluorometers detektiert und der prozentuale Anteil bezogen auf die Ausgangszellzahl (*Input*) ermittelt. MW ± SD von 4 unabhängigen Experimenten. * = p < 0,05; ns = nicht signifikant; Mann-Whitney-Test. (C) CD4⁺ T-Zellen aus OT-II-Tieren wurden zu LSEC-Monolayer, kultiviert auf Transwell®-Filtereinsätzen, in die obere Transwell®-Kammer gegeben. In die untere Kammer transmigrierte Zellen wurden nach 90 min geerntet, mit Fluoresbrite™ Beads versetzt und nach Markierung mit einem anti-CD4 Antikörper am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Transmigrationsrate als % des *Inputs*. MW ± SD von 4 unabhängigen Experimenten. * = p < 0,05; ns = nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

4.1.2 Antigenabhängige Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in die Leber

Um den Einfluss einer Antigenpräsentation durch das Lebersinusendothel auf die Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellpopulationen in die Leber *in vivo* zu untersuchen, wurden *Homingassays* durchgeführt. Zunächst wurde die Migration antigenspezifischer naiver und Effektor CD4⁺ T-Zellen bei ubiquitärer Antigenpräsentation untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob in dem gewählten Versuchsmodell die Antigenpräsentation durch professionelle und nicht-professionelle APC einen Einfluss auf die Migration dieser beiden CD4⁺ T-Zellpopulationen hat.

Radioaktiv markierte, OVA-spezifische naive CD4⁺ T-Zellen oder *in vitro* differenzierte Th1-Zellen wurden mit oder ohne dem OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid i.v. in WT-Mäuse transferiert und nach 24 h die in den Organen und dem Restkörper enthaltene Radioaktivität bestimmt. Die Migration antigenspezifischer naiver CD4⁺ T-Zellen wurde durch i.v. Gabe des Antigens nicht beeinflusst (Abb. 10A). OVA-spezifische Th1-Zellen migrierten nach Gabe des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids signifikant stärker in die Leber, während die Migration in die pLN und die Milz signifikant verringert war (Abb. 10B).

Um zu untersuchen, ob die gezeigten Unterschiede bei der organspezifischen Migration von antigenspezifischen Th1-Zellen auf die ubiquitäre Antigenpräsentation in WT-Mäusen zurückzuführen sind, wurden *Homingassays* mit MHC-II^{-/-}-Mäusen durchgeführt, deren APC kein MHC-II exprimieren und somit nicht in der Lage sind, CD4⁺ T-Zellen Antigene zu präsentieren. Nach dem i.v. Transfer von OVA-spezifischen Th1-Zellen zusammen mit dem OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid in MHC-II^{-/-}-Mäuse war deren organspezifische Migration vergleichbar mit der in WT-Mäusen, die kein Antigen erhalten hatten und lag in der Leber bei $44,2 \pm 1,9$ %, in den pLN bei $0,9 \pm 0,1$ % und in der Milz bei $26,4 \pm 1,7$ % (MW \pm SD; n = 3 Tiere).

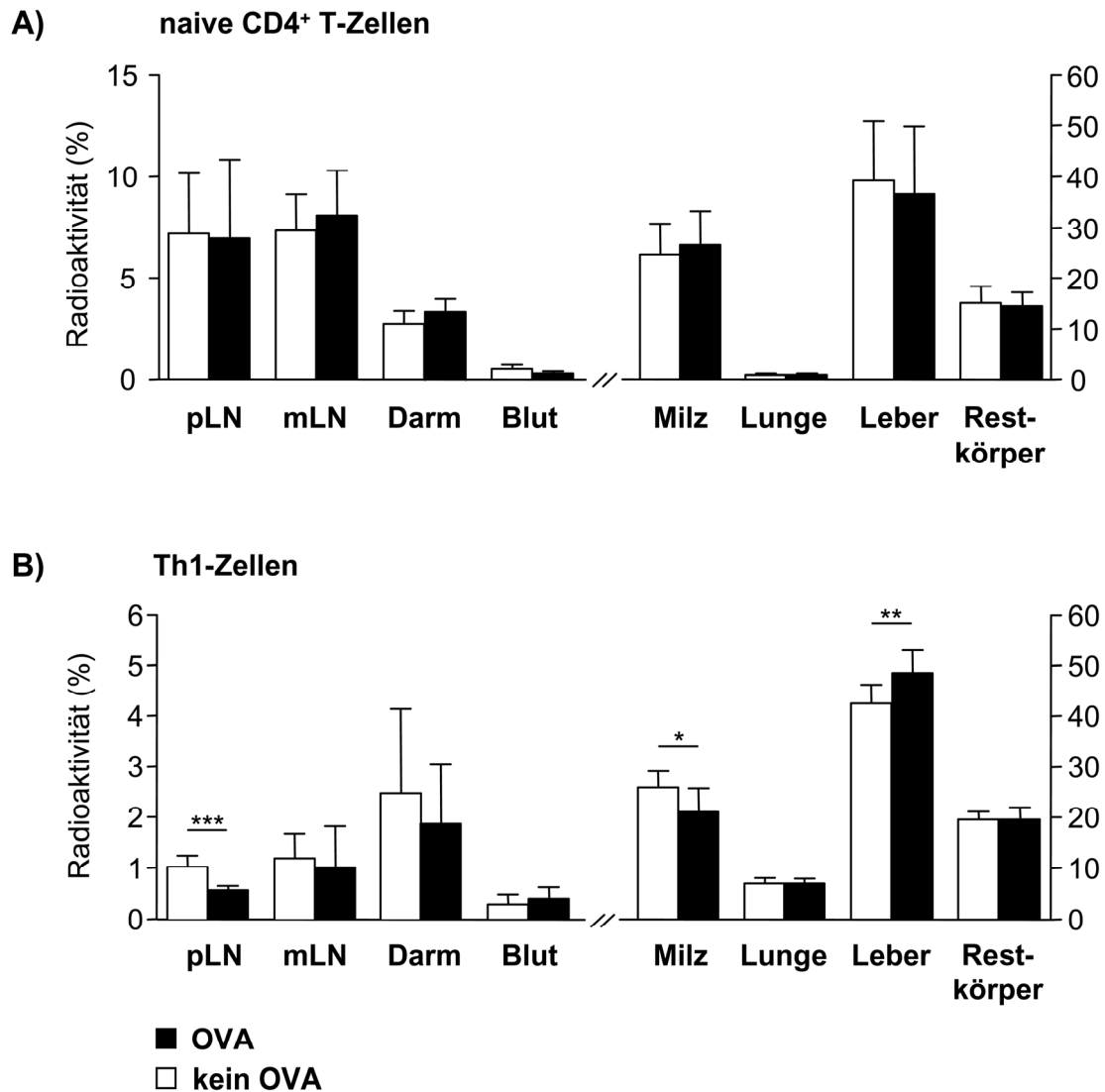


Abb. 10. Migration von OVA-spezifischen naiven CD4⁺ T-Zellen oder Th1-Zellen bei ubiquitärer Antigenpräsentation nach einmaliger i.v. Gabe des Antigens. C57BL/6-Mäusen wurden radioaktiv markierte (A) CD4⁺ CD62L^{high} T-Zellen aus OT-II-Mäusen oder (B) Th1-Zellen, *in vitro* differenziert aus naiven OT-II-CD4⁺ T-Zellen, zusammen mit dem OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid i.v. transferiert. Die Vergleichsgruppen erhielten kein Antigen. Nach 24 h wurden die organspezifische Radioaktivität und die Radioaktivität des Blutes und Restkörpers bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der in den angegebenen Organen nachgewiesenen Radioaktivität bezogen auf die gesamte transferierte Radioaktivität. MW ± SD aus (A) zwei unabhängigen Experimenten und (B) drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Tieren pro Gruppe. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; Mann-Whitney-Test.

Da eine ubiquitäre Antigenpräsentation nach einmaliger i.v. Gabe des Antigens nur einen Einfluss auf die Migration von antigenspezifischen Th1-Zellen, nicht jedoch auf die von OVA-spezifischen naiven $CD4^+$ T-Zellen hatte, wurden weiterführende Versuche mit Th1-Zellen durchgeführt. Um eine antigenabhängige Rekrutierung von Th1-Zellen bei einer MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation durch das Lebersinusendothel untersuchen zu können, wurden $MHC-II^{-/-} \rightarrow WT$ -Knochenmarkchimären generiert, bei denen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation auf nicht-hämatopoetische APC beschränkt war, zu denen vor allem die LSEC zählen.

Um einen Einfluss der Knochenmarktransplantation auf die Antigenpräsentation in den Chimären auszuschließen, wurden zunächst *Homingassays* mit $WT \rightarrow WT$ -Chimären durchgeführt. Diese Chimären unterschieden sich hinsichtlich des prozentualen Anteils $MHC-II^+$ Zellen im Blut nicht von WT-Mäusen (Abb. 7) und sollten in der Lage sein, Antigene ubiquitär zu präsentieren. Nach i.v. Gabe des $OVA_{323-339}$ -Peptids stieg der Anteil in die Leber migrierender antigenspezifischer Th1-Zellen von $43,2 \pm 3,0 \%$ auf $51,9 \pm 0,7 \%$ an, während er sich in den pLN von $0,7 \pm 0,2 \%$ auf $0,3 \pm 0,1 \%$ und in der Milz von $17,4 \pm 2,2 \%$ auf $11,4 \pm 1,0 \%$ ($MW \pm SD$; $n = 3$ Tiere) verringerte. Diese antigenabhängige Änderung der Migration von OVA-spezifischen Th1-Zellen in $WT \rightarrow WT$ -Chimären war vergleichbar mit der in WT-Mäusen (Abb. 10B). Die Knochenmarktransplantation beeinträchtigte somit die Fähigkeit der Antigenpräsentation durch APC nicht.

Bei einer auf LSEC beschränkten Antigenpräsentation in den $MHC-II^{-/-} \rightarrow WT$ -Chimären war nach einmaliger i.v. Gabe des $OVA_{323-339}$ -Peptids die organspezifische Migration antigenspezifischer Th1-Zellen nicht verändert (Abb. 11). Daraufhin wurden $MHC-II^{-/-} \rightarrow TF$ -OVA-Chimären generiert, in denen OVA als membranständiges Protein durch Zellen der Leber konstitutiv exprimiert wird. In einem ersten Versuch migrierten

OVA-spezifische Th1-Zellen ($40,1 \pm 3,6 \%$) im Vergleich zu WT-Th1-Zellen ($35,7 \pm 0,4 \%$; MW \pm SD; n = 3 Tiere) stärker in die Leber von MHC-II^{-/-} \rightarrow TF-OVA-Chimären.

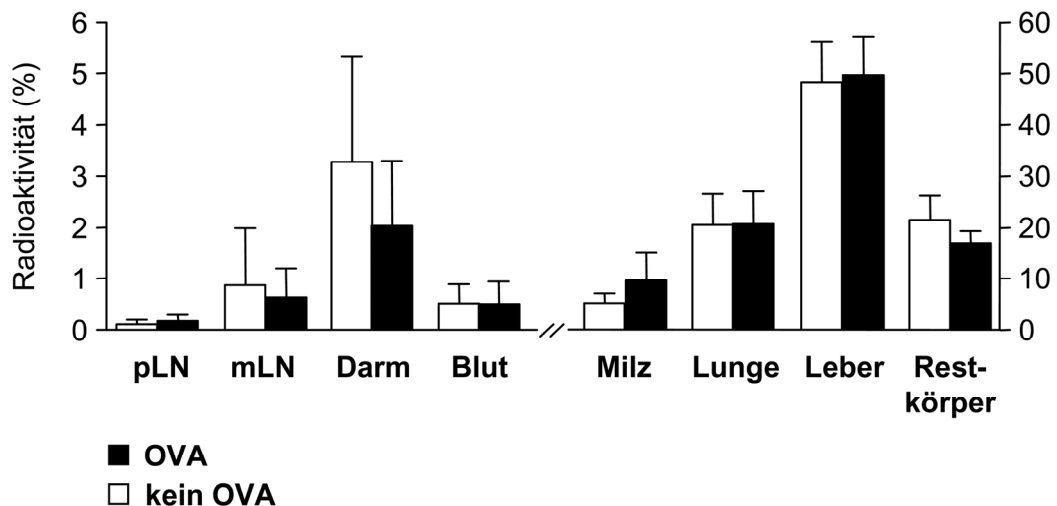


Abb. 11. Migration von antigenspezifischen Th1-Zellen bei einer auf das Lebersinusendothel beschränkten Antigenpräsentation nach einmaliger i.v. Gabe des Antigens. MHC-II^{-/-} \rightarrow WT-Chimären erhielten i.v. radioaktiv markierte OT-II-Th1-Zellen zusammen mit dem OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid. Die Vergleichsgruppe bekam kein Antigen. Der Versuch erfolgte wie in Abb. 10 beschrieben. MW \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe.

Zusammenfassend führte eine ubiquitäre Antigenpräsentation nach einmaliger i.v. Gabe des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids zu einer erhöhten Migration von antigenspezifischen Th1-Zellen in die Leber, während eine auf LSEC beschränkte Antigenpräsentation in diesem experimentellen Ansatz keinen Einfluss auf die Migration von Effektor CD4⁺ T-Zellen in die Leber hatte. Erste Daten wiesen darauf hin, dass bei endogener hepatischer Expression von OVA eine auf das Lebersinusendothel beschränkte Antigenpräsentation die Migration von antigenspezifischen Th1-Zellen in die Leber verstärkt.

4.2 Induktion eines Darm-*Homing*phänotyps bei CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel

Durch APC aktivierte T-Zellen exprimieren spezifische *Homing*rezeptoren, die es den Zellen ermöglichen, in bestimmte periphere Gewebe und an den Ort einer Infektion oder Entzündung zu migrieren. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob LSEC, als eine Population von nicht-professionellen APC der Leber, die Expression von gewebespezifischen *Homing*rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen induzieren und die Migration und damit den Wirkort von in der Leber aktivierten CD4⁺ T-Zellen beeinflussen.

4.2.1 Organspezifische Migration von LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen

Es wurde die organspezifische Migration LSEC-aktivierter CD4⁺ T-Zellen (T_{LSEC}) im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen, die durch APC der Milz (T_{SAPC}) aktiviert wurden, *in vivo* untersucht, um mögliche, durch die aktivierende APC-Population induzierte Unterschiede aufzuzeigen.

Zunächst wurde mittels Proliferationsassays untersucht, ob LSEC naive CD4⁺ T-Zellen antigenabhängig aktivieren. Nach *in-vitro*-Kokulturen von LSEC oder APC der Milz (SAPC) mit OVA-spezifischen, naiven CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids wurde die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen (Abb. 12A).

Um die Migration der durch LSEC oder SAPC aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden radioaktiv markierte T_{LSEC} bzw. T_{SAPC} i.v. in WT-Mäuse gespritzt und nach 24 h die organspezifische Radioaktivität ermittelt. T_{SAPC} wurden hauptsächlich in der Leber und der Milz gefunden, während nur wenige T_{SAPC} in die Lymphknoten oder den Darm migrierten. T_{LSEC} migrierten ebenfalls in die Leber, wenn

auch signifikant weniger als T_{SAPC} . Dagegen migrierten T_{LSEC} signifikant stärker in die sekundären lymphatischen Organe und den Darm (Abb. 12B).

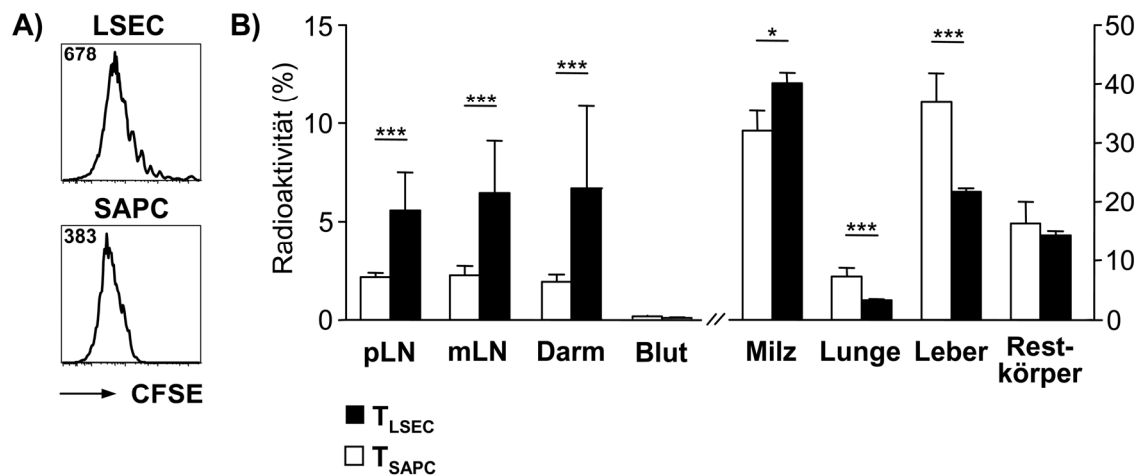


Abb. 12. Proliferation und organspezifische Migration von LSEC-aktivierten $CD4^+$ T-Zellen. (A) $CD4^+ CD62L^{high}$ T-Zellen aus OT-II-Mäusen wurden mit CFSE markiert und 6 d mit LSEC oder SAPC aus C57BL/6-Mäusen in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids kokultiviert. Die Proliferation der T_{LSEC} bzw. T_{SAPC} wurde am Durchflusszytometer durch die Bestimmung der Abnahme des zellulären CFSE-Gehaltes ermittelt. Der GFI von CFSE ist angegeben. Die Histogramme zeigen ein repräsentatives von mindestens 4 unabhängigen Experimenten. (B) Radioaktiv markierte T_{LSEC} oder T_{SAPC} wurden i.v. in C57BL/6-Mäuse gespritzt. Der Versuch wurde wie in Abb. 10 beschrieben durchgeführt. MW \pm SD von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-5 Tieren pro Gruppe. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; Mann-Whitney-Test.

4.2.2 Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren auf T_{LSEC}

Ausgehend von dem Ergebnis, dass T_{LSEC} im Vergleich zu T_{SAPC} stärker in den Darm migrierten (Abb. 12), konzentrierten sich die weiterführenden Arbeiten auf die Fähigkeit von LSEC, darmspezifische *Homing*rezeptoren zu induzieren und damit auf die Möglichkeit von in der Leber aktivierten $CD4^+$ T-Zellen in den Darm zu migrieren.

Das Potential von LSEC, einen Darm-*Homing*phänotyp zu induzieren, wurde im Vergleich zu SAPC sowie mLN-DC untersucht. Dazu wurden Kokulturen mit den verschiedenen APC-Populationen und antigenspezifischen, naiven $CD4^+$ T-Zellen

durchgeführt. Die CD4⁺ T-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression der darmspezifischen *Homing*rezeptoren $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9, der für die Migration in die Haut und entzündete Gewebe benötigten Expression von P-Lig sowie der Expression des für die Einwanderung in die Lymphknoten notwendigen *Homing*rezeptors CD62L analysiert.

Naive CD4⁺ T-Zellen exprimierten vor der Kokultur neben CD62L sehr wenig $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und kein CCR9 oder P-Lig (Abb. 13A). CD4⁺ T-Zellen, die mit mLN-DC kokultiviert wurden (T_{mLN-DC}), exprimierten viel $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 sowie wenig P-Lig. Die CD62L-Expression blieb hoch. Das Expressionsprofil der *Homing*rezeptoren von LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen war vergleichbar mit dem von T_{mLN-DC}, mit hoher Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CD62L sowie niedriger P-Lig-Expression. T_{LSEC} exprimierten ebenfalls CCR9, jedoch in geringerem Ausmaß als T_{mLN-DC}. Von SAPC aktivierte CD4⁺ T-Zellen exprimierten wenig $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CD62L sowie kein CCR9. Die Expression von P-Lig auf T_{SAPC} war dagegen höher als die auf T_{LSEC} oder T_{mLN-DC} (Abb. 13B).

Die Ergebnisse belegen, dass von LSEC oder mLN-DC aktivierte CD4⁺ T-Zellen die darmspezifischen *Homing*rezeptoren $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 exprimierten, während SAPC nur wenig $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, dafür jedoch viel P-Lig auf CD4⁺ T-Zellen induzierten.

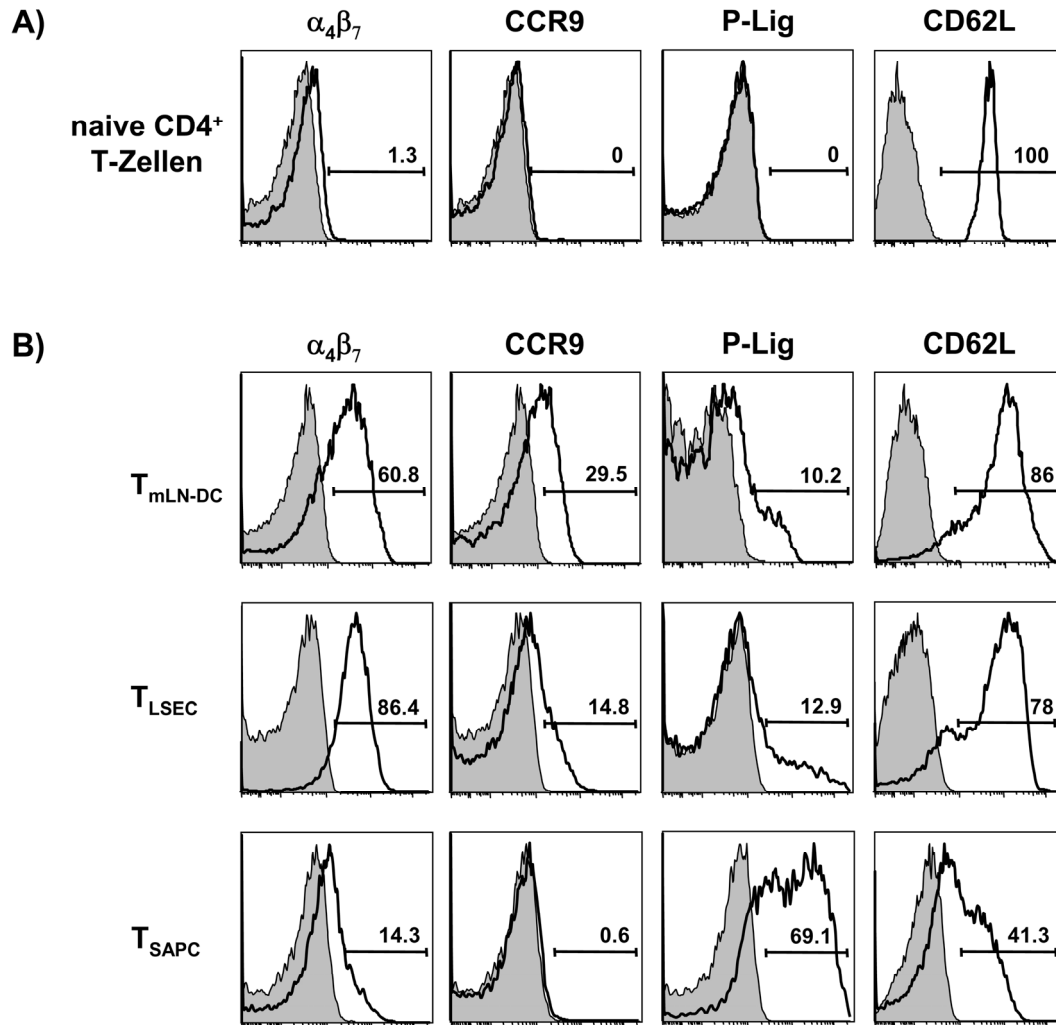


Abb. 13. Expression gewebespezifischer Homingrezeptoren. CD4⁺ CD62L^{high} T-Zellen aus OT-II Mäusen wurden für 6 d mit LSEC oder SAPC aus C57BL/6-Mäusen in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids kokultiviert. Aus C57BL/6-Tieren isolierte mLN-DC wurden für 2 h mit dem OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid gepulst und anschließend 4 d mit CD4⁺ CD62L^{high} T-Zellen aus OT-II-Mäusen kokultiviert. (A) Naive oder (B) aktivierte CD4⁺ T-Zellen wurden mit einem anti- $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, anti-CCR9 oder anti-CD62L Antikörper markiert. Zur Ermittlung der P-Lig-Expression wurden die Zellen mit einem anti-Maus P-Selektin/Mensch-IgG Fc-Chimärenprotein und einem anti-Mensch IgG Fc gefärbt. Die Zellen wurden am Durchflusszytometer analysiert. Es sind repräsentative Histogramme aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Ausgefüllte Kurve, unmarkierte Zellen; verstärkte Linie, Antikörperfärbung. Prozentuale Anteile $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺, CCR9⁺, P-Lig⁺ und CD62L⁺ CD4⁺ T-Zellen sind angegeben.

4.2.3 Stabilität der Expression von *Homing*rezeptoren auf T_{LSEC}

Nachdem gezeigt wurde, dass LSEC die Expression von darmspezifischen *Homing*rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen induzieren, sollte weiterführend die Stabilität dieses Merkmals untersucht werden. Besonders interessant war, ob die Expression der *Homing*rezeptoren moduliert wird, wenn T_{LSEC} durch andere APC als LSEC reaktiviert werden.

T_{LSEC} wurden mit SAPC oder LSEC in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids kokultiviert und hinsichtlich ihrer Aktivierung sowie der Expression der darmspezifischen *Homing*rezeptoren und P-Lig untersucht. T_{LSEC} exprimierten weniger CD25 als T_{SAPC} (Kruse, et al., 2009) und diese niedrige CD25-Expression blieb nach fortgesetzter Kokultur mit LSEC auf gleichem Niveau. Dagegen führte eine Kokultur von T_{LSEC} mit SAPC zu einer signifikant erhöhten Expression von CD25. Die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin blieb unabhängig davon, ob T_{LSEC} mit SAPC oder LSEC kokultiviert wurden auf dem Ausgangsniveau der T_{LSEC} vor der Reaktivierung. Im Gegensatz dazu wurden CCR9⁺ CD4⁺ T-Zellen nur nach Restimulierung mit LSEC nachgewiesen. Nach Reaktivierung mit SAPC war die Expression von CCR9 signifikant reduziert. Die Expression von P-Lig verblieb nach Kokultur der T_{LSEC} mit LSEC auf niedrigem Niveau, stieg jedoch in Anwesenheit von SAPC signifikant an (Abb. 14).

Somit exprimierten T_{LSEC} unabhängig von der für die Reaktivierung eingesetzten APC-Population $\alpha_4\beta_7$ -Integrin. Die Expressionshöhe von CCR9 und P-Lig war dagegen abhängig von der für die Restimulierung verwendeten APC-Population.

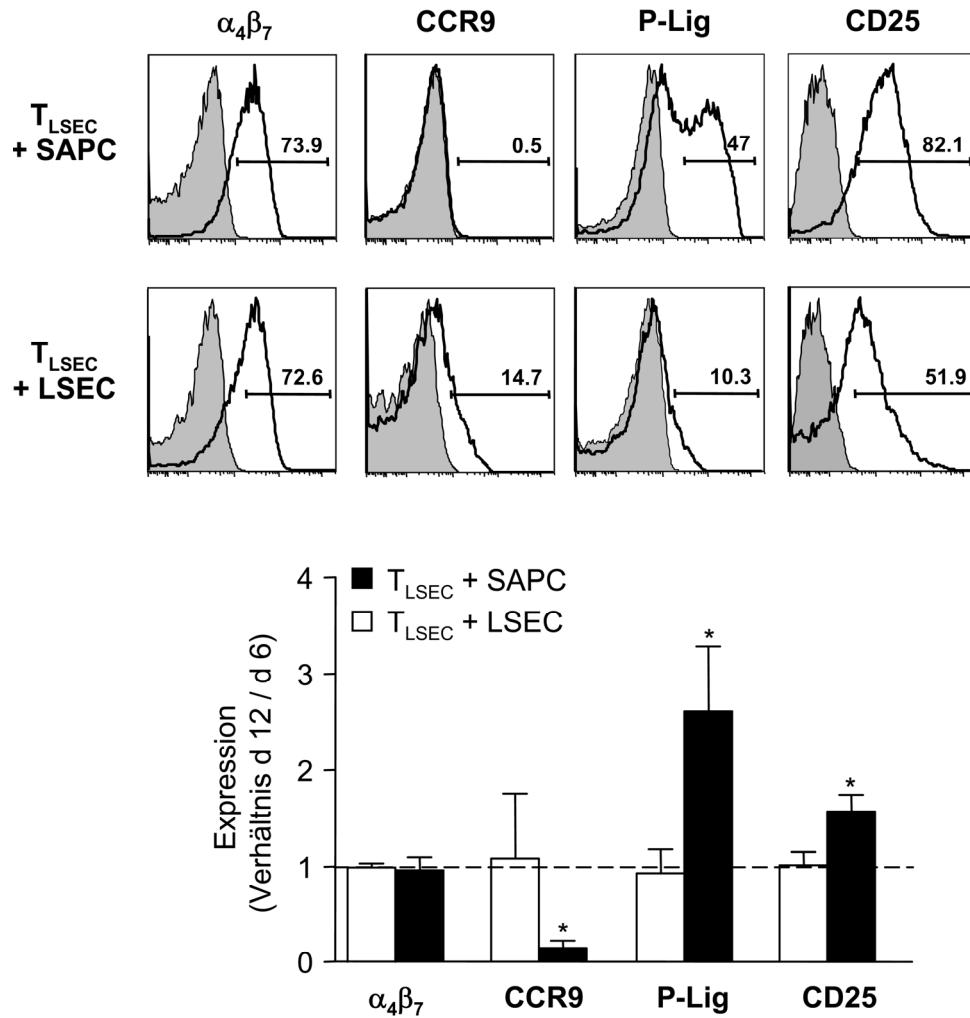


Abb. 14. Stabilität des Phänotyps von T_{LSEC} nach Reaktivierung durch SAPC. T_{LSEC} wurden nach 6 d Kultur geerntet und für weitere 6 d mit LSEC oder SAPC in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids kokultiviert. Nach insgesamt 12 d Kultur wurden die CD4⁺ T-Zellen geerntet und mit einem anti- $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, anti-CCR9, anti-CD25 Antikörper oder einem anti-Maus-P-Selektin/Mensch-IgG Fc-Chimärenprotein und einem anti-Mensch IgG Fc markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, unmarkierten Zellen; verstärkte Linie, Antikörperfärbung. Der prozentuale Anteil $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺, CCR9⁺, P-Lig⁺ und CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen ist angegeben. Das Diagramm zeigt die Expression (%) der verschiedenen Oberflächenmoleküle am Tag 12 der Kultur im Verhältnis zu deren Expression (%) am Tag 6 der Kultur. Die gestrichelte Linie markiert gleiche Expressionsstärken. MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$, One-Sample t-Test.

4.2.4 Einfluss der Retinolsäure auf die Induktion eines Darm- *Homing*phänotyps bei T_{LSEC}

GALT-DC induzieren in Anwesenheit von Retinolsäure darmspezifische *Homing*rezeptoren und supprimieren die Expression von P-Lig auf aktivierten T-Zellen (Iwata, et al., 2004). Daher wurde untersucht, welchen Einfluss Retinolsäure und das *Signaling* über den von T-Zellen exprimierten Retinolsäurerezeptor auf die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, CCR9 und P-Lig auf T_{LSEC} hat.

T_{LSEC} wurden in An- oder Abwesenheit von LE 540, einem Antagonisten des Retinolsäurerezeptors, generiert. Durch die Blockade des Retinolsäurerezeptors wurde der prozentuale Anteil $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ T_{LSEC} signifikant reduziert und war noch niedriger als der Anteil $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ T_{SAPC}. Der prozentuale Anteil CCR9⁺ T_{LSEC} verringerte sich ebenfalls in Anwesenheit von LE 540 signifikant und unterschied sich nicht mehr vom Anteil CCR9⁺ T_{SAPC}. Die Blockade des Retinolsäurerezeptors auf T_{LSEC} hatte auch Auswirkungen auf die Expressionshöhe von P-Lig. Der Anteil P-Lig⁺ T_{LSEC} erhöhte sich signifikant und war vergleichbar mit dem Anteil P-Lig⁺ T_{SAPC} (Abb. 15).

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Inhibition des Retinolsäure-*Signaling* bei der antigenabhängigen Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen durch LSEC zu einer verringerten Expression darmspezifischer, bei gleichzeitig erhöhter Expression hautspezifischer *Homing*rezeptoren auf T_{LSEC} führte. Das Expressionsprofil dieser T_{LSEC} unterschied sich dabei nicht mehr von dem der T_{SAPC}.

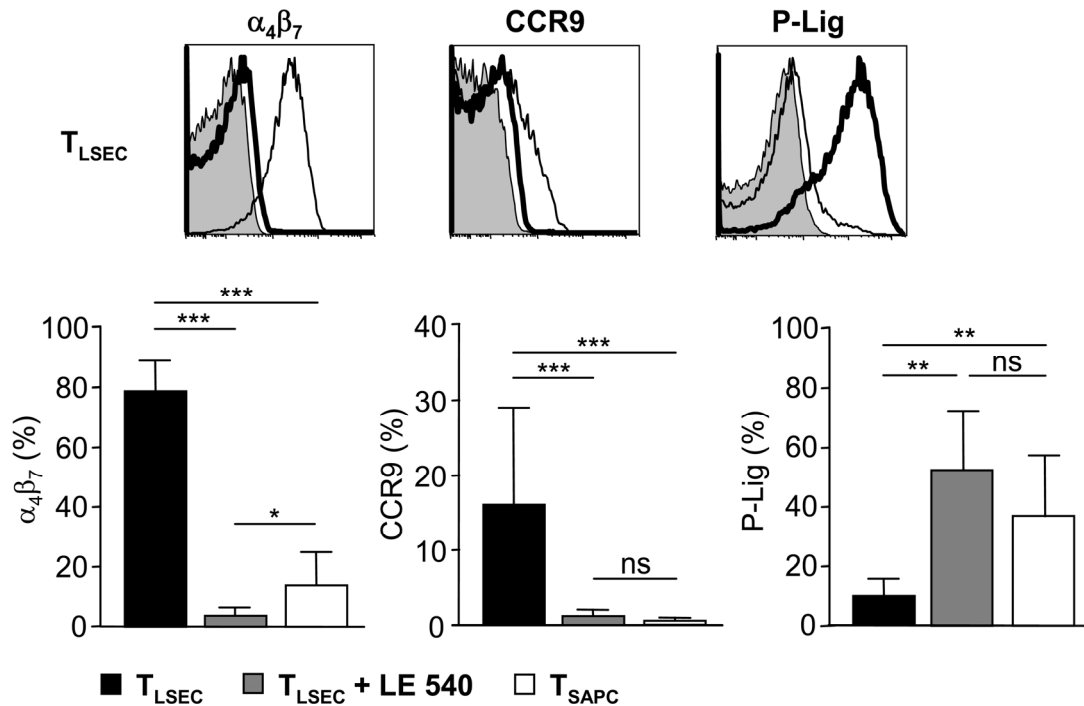


Abb. 15. Expression von darm- und hautspezifischen *Homingrezeptoren* auf T_{LSEC} in Abhängigkeit vom Retinolsäure-Signaling. T_{LSEC} wurden durch LSEC in An- oder Abwesenheit von LE 540 generiert. T_{SAPC} dienten als Vergleichsgruppe. Die Expression darm- und hautspezifischer *Homingrezeptoren* wurde am Durchflusszytometer analysiert. Die Histogramme zeigen repräsentative Daten der T_{LSEC}. Ausgefüllte Kurve, unmarkierte T_{LSEC}; schmale Linie, ohne LE 540; verstärkte Linie, mit LE 540. Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺, CCR9⁺ und P-Lig⁺ T_{LSEC} oder T_{SAPC}. MW \pm SD von 5 unabhängigen Experimenten. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; ns = nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

Nachdem gezeigt wurde, dass T_{LSEC} darmspezifische *Homingrezeptoren* exprimieren, sollte ihre Fähigkeit, in bestimmte Kompartimente und lymphatische Organe des Darms zu migrieren, weiter untersucht werden. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Analyse, ob die durch die Blockierung des Retinolsäurerezeptors *in vitro* beobachteten Änderungen in der Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 auf T_{LSEC} Auswirkungen auf deren Migration *in vivo* haben.

Damit T-Zellen auf das Chemokin CCL25 im Darmgewebe chemotaktisch reagieren können, muss der Chemokinrezeptor CCR9 funktionell sein. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob CCL25 für den von T_{LSEC} exprimierten CCR9 chemotaktisch wirkt. T_{LSEC}

wurden in An- oder Abwesenheit von LE 540 generiert und in Transmigrationsassays eingesetzt. T_{SAPC}, die kein CCR9 exprimierten (Abb. 13 und 15), zeigten keine chemotaktische Reaktion auf CCL25 (Abb. 16A). Die Transmigrationsrate der T_{LSEC} stieg in Anwesenheit von CCL25 signifikant an. Die Blockierung des Retinolsäure-Signaling bei der Generierung der T_{LSEC} reduzierte deren Expression von CCR9 auf das Niveau von T_{SAPC} (Abb. 15) und führte zu einer signifikanten Verringerung der Transmigration gegen CCL25. Diese war vergleichbar mit dem prozentualen Anteil gegen CCL25 transmigrierender T_{SAPC} (Abb. 16A).

Zur Analyse der darmspezifischen Migration von T_{LSEC} *in vivo* wurden diese in *Homingassays* eingesetzt. Es wurde der prozentuale Anteil der in das Dünndarm- und Dickdarmgewebe sowie in die mLN und PP eingewanderten Zellen bestimmt. T_{LSEC}, die viel CD62L exprimierten (Abb. 13) migrierten signifikant stärker als T_{SAPC}, die wenig CD62L exprimierten (Abb. 13), in die mLN. Die Blockierung des Retinolsäurerezeptors während der Induktion der T_{LSEC} hatte keinen Einfluss auf die Migration der T_{LSEC} in die mLN. T_{SAPC}, die wenig $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und kein CCR9 exprimierten (Abb. 13 und 15), wurden nicht in PP und nur sehr wenig im Dünndarm- oder Dickdarmgewebe gefunden (Abb. 16B). Im Gegensatz dazu migrierten T_{LSEC}, die sowohl $\alpha_4\beta_7$ -Integrin als auch einen funktionellen CCR9 exprimierten (Abb. 13, 15 und 16A), signifikant stärker in die PP sowie in das Dünndarm- und Dickdarmgewebe. In Anwesenheit von LE 540 generierte T_{LSEC} migrierten dagegen nicht in die PP und in mit T_{SAPC} vergleichbar niedrigen Migrationsraten in das Dünndarm- und Dickdarmgewebe (Abb. 16B).

CD4⁺ T-Zellen migrierten somit nur in das Darmgewebe und die PP wenn sie durch LSEC, nicht jedoch wenn sie durch SAPC aktiviert wurden. Die Induktion der für den Darmtropismus erforderlichen *Homing*rezeptoren erfolgte dabei in Abhängigkeit von Retinolsäure.

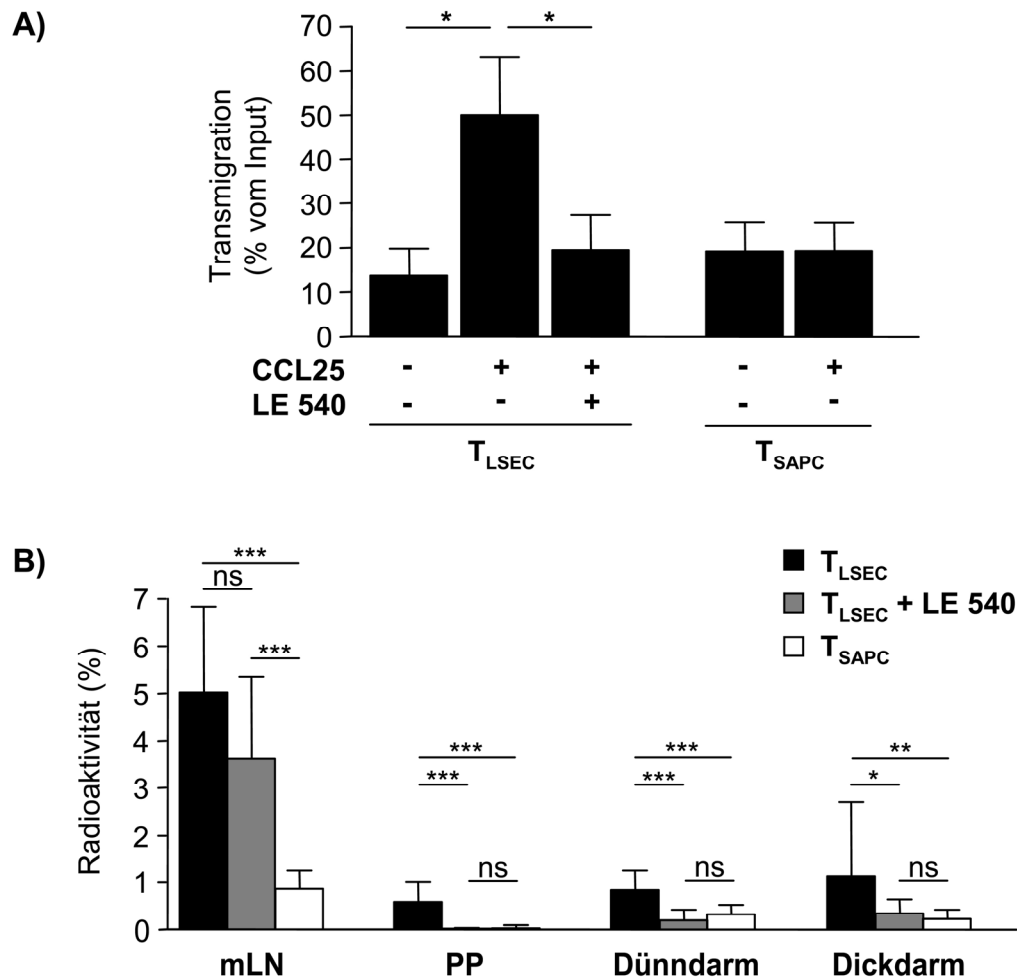


Abb. 16. Chemotaxis der T_{LSEC} gegenüber CCL25 und Migration von T_{LSEC} in bestimmte Bereiche des Darms und GALT in Abhängigkeit vom Retinolsäure-Signaling. T_{LSEC} wurden in An- oder Abwesenheit von LE 540 generiert. T_{SAPC} dienten als Vergleichsgruppe. (A) T_{LSEC} oder T_{SAPC} wurden in die obere Transwell®-Kammer gegeben. CCL25 war während des Transmigrationsassays in der unteren Kammer vorhanden. Die Versuche wurden wie in Abb. 9 beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist die Transmigrationsrate als % des Inputs. MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten. (B) C57BL/6-Mäuse erhielten i.v. radioaktiv markierte T_{LSEC} oder T_{SAPC} . Nach 24 h wurde die organspezifische Radioaktivität bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der in den angegebenen Organen nachgewiesenen Radioaktivität bezogen auf die gesamte transferierte Radioaktivität. MW \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 4-5 Tieren pro Gruppe. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

4.2.5 Induktion eines Darm-*Homing*phänotyps bei Th1-Zellen durch LSEC

Aktivierte und Effektor/*Memory* T-Zellen migrieren präferentiell in die Leber, wo sie deletiert oder moduliert werden (Klugewitz, et al., 2002a; Limmer, et al., 2005; Mehal, et al., 1999). Dahingehend war von Interesse, ob aufgrund einer Restimulierung antigenspezifischer Effektor CD4⁺ T-Zellen durch LSEC deren *Homing*phänotyp moduliert wird.

OVA-spezifische, *in vitro* differenzierte Th1-Zellen wurden mit LSEC oder SAPC in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids kokultiviert und hinsichtlich der Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin untersucht. Th1-Zellen exprimierten initial kein $\alpha_4\beta_7$ -Integrin. Die Reaktivierung der Effektor CD4⁺ T-Zellen durch SAPC führte zu einer niedrigen Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin. Im Gegensatz dazu war nach der antigenabhängigen Restimulierung von Th1-Zellen durch LSEC die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin signifikant erhöht (Abb. 17A).

*Homing*assays wurden durchgeführt, um die darmspezifische Migration von *in vitro* restimulierten Th1-Zellen *in vivo* zu untersuchen. Durch LSEC reaktivierte Th1-Zellen migrierten signifikant stärker in die mLN, PP sowie das Dün- und Dickdarmgewebe als Th1-Zellen, die durch SAPC restimuliert worden waren (Abb. 17B).

Die Daten belegen, dass LSEC die Expression des darmspezifischen *Homing*rezeptors $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Th1-Zellen induzierten, die daraufhin verstärkt in das Darmgewebe und das GALT migrierten.

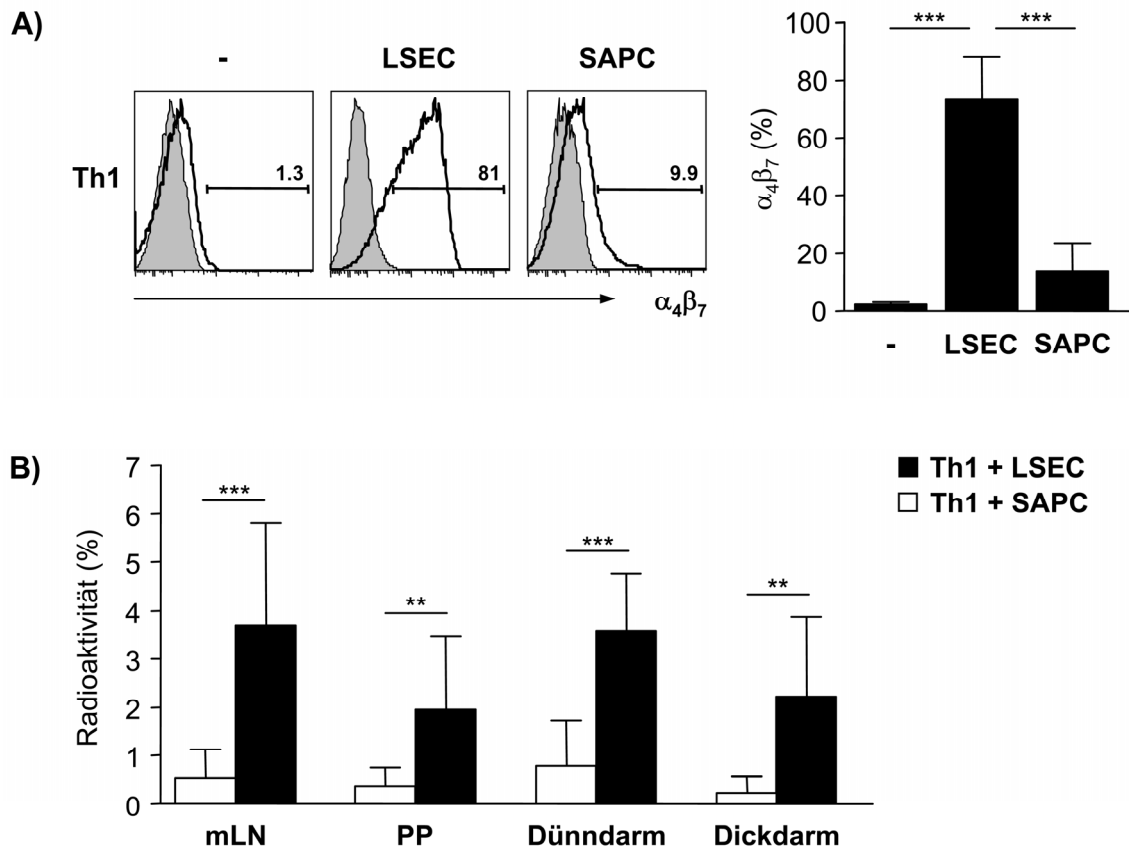


Abb. 17. Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Th1-Zellen und darmspezifische Migration nach Restimulation durch LSEC. (A) OVA-spezifische Th1-Zellen, *in vitro* differenziert aus naiven OT-II-CD4 $^+$ T-Zellen, wurden durch LSEC oder SAPC in Anwesenheit des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids für drei Tage kokultiviert. Die restimulierten CD4 $^+$ T-Zellen wurden mit einem anti- $\alpha_4\beta_7$ -Integrin Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Histogramme zeigen repräsentative Daten. Ausgefüllte Kurve, unmarkierte Zellen; verstärkte Linie, Antikörperfärbung. Der prozentuale Anteil $\alpha_4\beta_7^+$ Integrin $^+$ CD4 $^+$ T-Zellen ist in den Histogrammen sowie im Diagramm angegeben. MW \pm SD von mindestens 4 unabhängigen Experimenten. (B) Radioaktiv markierte Th1-Zellen, restimuliert durch LSEC oder SAPC, wurden i.v. in C57BL/6 Mäuse gespritzt. Nach 24 h wurde die organspezifische Radioaktivität bestimmt und als prozentualer Anteil der in den angegebenen Organen nachgewiesenen Radioaktivität dargestellt. MW \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; Mann-Whitney-Test.

4.2.6 Expression funktioneller RALDH in LSEC

GALT-DC exprimieren spezifische Enzyme, die RALDH, mit denen sie mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin A zu Retinolsäure metabolisieren und damit die Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren auf aktivierten T-Zellen induzieren (Iwata, et al., 2004). Es war nicht bekannt, ob LSEC die enzymatische Ausstattung zur

Metabolisierung des in der Leber reichlich vorhandenen Vitamin A zu Retinolsäure und dadurch das Potential zur Induktion des Darm-*Homing*phänotyps bei T_{LSEC} haben. Deshalb wurde untersucht, ob LSEC RALDH exprimieren und so über die Bereitstellung von Retinolsäure die Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen induzieren.

Die mRNA-Expression der vier RALDH-Isoformen in LSEC wurde mittels reverser Transkription und anschließender PCR analysiert. Es wurde eine hohe mRNA-Expression von RALDH1 und eine niedrigere Expression von RALDH4 in LSEC und im Lebergewebe nachgewiesen. Die sehr schwache Expression von RALDH3 in LSEC stellte sich erst nach Verwendung 4-fach höherer cDNA-Mengen dar. Weder in LSEC noch im Lebergewebe war die mRNA von RALDH2 nachweisbar, während beide im Gewebe der mLN exprimiert waren (Abb. 18A).

RALDH1, die auf transkriptionaler Ebene in LSEC und im Lebergewebe überwiegend gefundene Isoform, die *all-trans*-Retinal in *all-trans*-Retinolsäure umsetzt (Sima, et al., 2009), wurde mittels Western Blot in LSEC und im Lebergewebe auf Proteinebene nachgewiesen (Abb. 18B).

Die enzymatische Aktivität der durch LSEC exprimierten RALDH wurde mit Hilfe des ALDEFLUOR[®]-Assays untersucht. Der Anteil ALDEFLUOR⁺ LSEC oder mLN-DC war im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die zusätzlich mit dem RALDH-Inhibitor DEAB inkubiert wurden, signifikant erhöht. DC aus den pLN, die keinen Darm-*Homing*phänotyp bei T-Zellen induzieren (Iwata, et al., 2004), zeigten dagegen keine RALDH-Aktivität (Abb. 18C).

Da im ALDEFLUOR[®]-Assay nicht nur die enzymatische Aktivität der RALDH sondern auch die anderer Aldehyddehydrogenasen erfasst wird, wurde zum weiteren Nachweis der Expression von funktionellem RALDH1 in LSEC deren Fähigkeit, Vitamin A zu

Retinolsäure umzusetzen und dadurch die Expression von darmspezifischen *Homing*rezeptoren zu induzieren, untersucht.

Es wurden Kokulturen mit antigenspezifischen, naiven CD4⁺ T-Zellen und LSEC aus Vit A⁻-Mäusen in An- oder Abwesenheit von Retinol (Vitamin A) durchgeführt und die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf den T_{LSEC} bestimmt. Der prozentuale Anteil $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ T_{LSEC}, die aus Kokulturen mit LSEC aus Vit A⁻-Mäusen hervorgingen, war signifikant niedriger als der von T_{LSEC}, generiert durch WT-LSEC (Abb. 18D). Retinol selbst hatte keinen induzierenden Einfluss auf die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin. Nach Zugabe von Retinol zu Kulturen, in denen naive CD4⁺ T-Zellen über CD3 und CD28 aktiviert wurden, war die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf den CD4⁺ T-Zellen, verglichen mit CD4⁺ T-Zellen, die ohne Zugabe von Retinol aktiviert wurden, nicht verändert (Anstieg $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺CD4⁺ T-Zellen: $2,9 \pm 1,0$ %; MW \pm SD; n = 3). Auch die Expressionshöhe von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf durch WT-LSEC aktivierte CD4⁺ T-Zellen wurde durch Zugabe von Retinol nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu führte bei der Generierung von T_{LSEC} durch LSEC aus Vit A⁻-Mäusen die Anwesenheit von Retinol zu einer signifikant erhöhten Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin im Vergleich zu den entsprechenden Kulturen ohne Retinol (Abb. 18D).

Damit wurde die Notwendigkeit von Retinolsäure, metabolisiert aus Vitamin A, für die Induktion der Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf T_{LSEC} gezeigt und dass LSEC mit RALDH1 die enzymatische Ausstattung für diese Induktion besitzen.

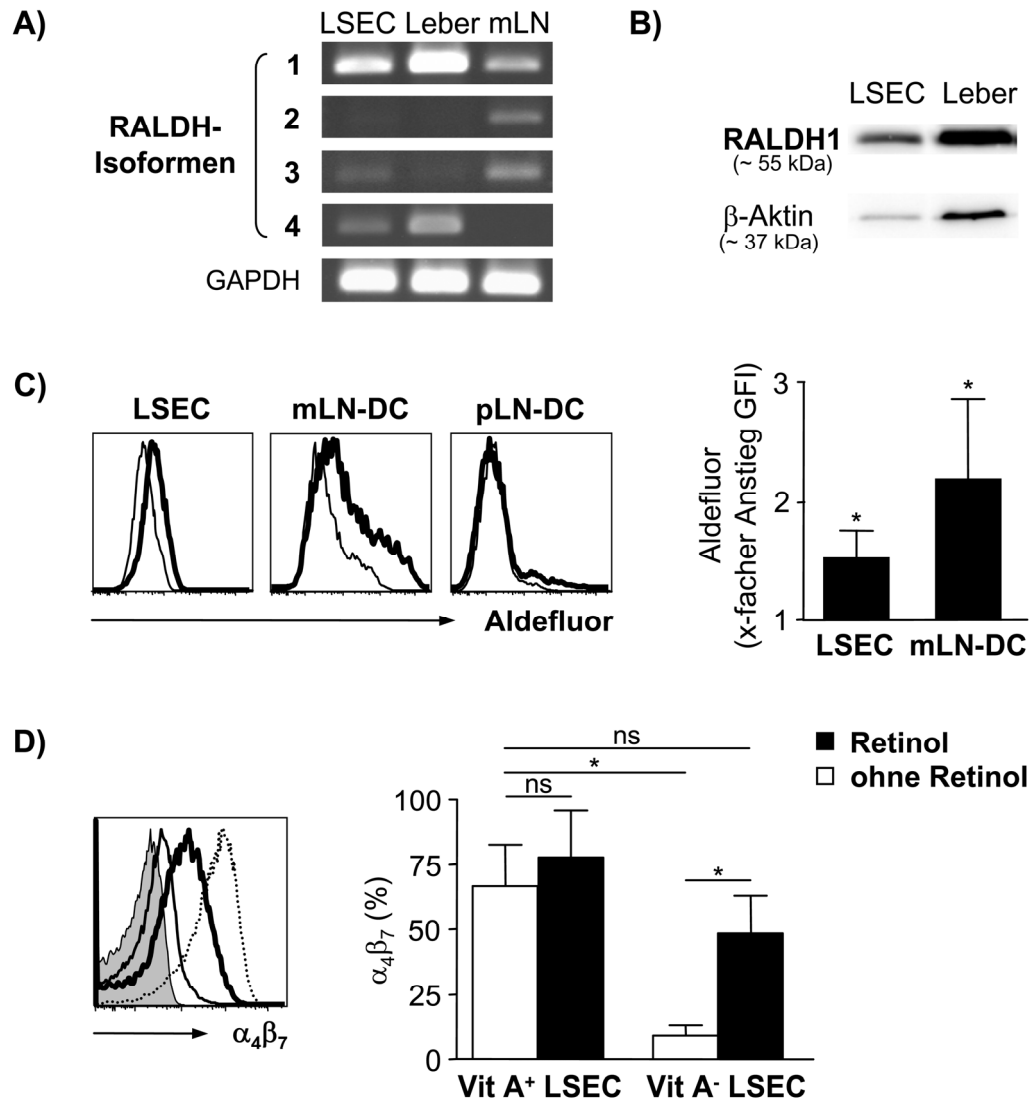


Abb. 18. Expression funktioneller RALDH in LSEC. (A) Gesamt-RNA wurde aus LSEC, Leber- und mLN-Gewebe isoliert, in cDNA revers transkribiert und hinsichtlich der Expression der RALDH-Isoformen mittels PCR analysiert. Als Haushaltsgen wurde GAPDH gewählt. Repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten. (B) Das Protein von RALDH1 wurde mittels Western Blot in LSEC und Lebergewebe nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin. Repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten. (C) Die RALDH-Aktivität von LSEC und mLN-DC wurde durch ALDEFLUOR[®] am Durchflusszytometer bestimmt. Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Schmale Linie, mit RALDH-Inhibitor DEAB; verstärkte Linie, ohne Inhibitor. Das Diagramm zeigt den x-fachen Anstieg der GFI von Aldefluor[®] von unbehandelten, im Verhältnis zu DEAB-behandelten APC. MW \pm SD von 4-6 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; *One-Sample* t-Test. (D) T_{LSEC} wurden durch LSEC aus Vit A⁻-Mäusen (Vit A⁻ LSEC) oder WT-LSEC (Vit A⁺ LSEC) in An- oder Abwesenheit von Retinol generiert und hinsichtlich der Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin am Durchflusszytometer analysiert. Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, unmarkierte T_{LSEC} ; gepunktete Linie, T_{LSEC} , generiert durch Vit A⁺ LSEC; schmale Linie, T_{LSEC} , generiert durch Vit A⁻ LSEC; verstärkte Linie, T_{LSEC} , generiert durch Vit A⁻ LSEC in Anwesenheit von Retinol. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ T_{LSEC} . MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

4.3 Chemokinabhängige Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel

Die Transmigration von T-Zellen durch das Lebersinusendothel ist eine Voraussetzung für die Etablierung von Immunantworten bei Entzündungen oder Infektionen der Leber. Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Extravasation von T-Zellen in das Lebergewebe. Vorangegangene Arbeiten zeigten *in vitro*, dass nach basolateraler Vorinkubation der LSEC mit den Chemokinen CXCL12 oder CXCL9 die Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch das Endothel erhöht war. Die Ergebnisse führten zu der Annahme, dass das Lebersinusendothel Chemokine durch Transzytose zur Verfügung stellt und dadurch einen direkten Einfluss auf die chemokinabhängige Migration von T-Zellen hat (Schrage, et al., 2008b).

Die zugrunde liegenden Mechanismen der Bereitstellung von Chemokinen durch das Lebersinusendothel wurden im dritten Teil dieser Arbeit *in vitro* untersucht. Ob eine Beeinflussung der endothelialen Chemokinbereitstellung *in vivo* Auswirkungen auf die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber hat und damit potentiell zur Verminderung entzündungsinduzierter T-Zellinfiltrationen beitragen kann, war nicht bekannt. Daher lag ein besonderer Fokus der Analysen auf den Möglichkeiten zur Inhibition der endothelialen Chemokinbereitstellung *in vitro* und den daraus resultierenden Auswirkungen auf die chemokinabhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel.

4.3.1 Endotheliale Chemokinaufnahme und die Rolle von Chemokinrezeptoren bei der Internalisierung von Chemokinen durch LSEC

Damit Chemokine über Transzytose durch Endothelzellen transportiert werden können, müssen sie internalisiert werden. Deshalb wurde untersucht, ob LSEC das homöostatische Chemokin CXCL12 und das inflammatorische Chemokin CXCL10 aufnehmen und über welche Mechanismen die Internalisierung erfolgt.

Zur Analyse der Chemokinaufnahme durch LSEC wurden auf Zellkulturplatten adhärierende LSEC-*Monolayer* für unterschiedlich lange Zeiträume mit fluorochrommarkiertem, löslichem CXCL12 oder CXCL10 bei 37°C oder 4°C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Bei einer Temperatur von 37°C wurden sowohl CXCL12 als auch CXCL10 zeitabhängig in LSEC aufgenommen. Nach einer Inkubation bei 4°C wurden keine fluoreszierenden Chemokine in den LSEC nachgewiesen (Abb. 19A).

Um eine basolaterale Chemokinaufnahme durch LSEC zu untersuchen, wurden diese von der Unterseite mit dem Chemokin in Kontakt gebracht. Dazu wurden auf Transwell®-Filtereinsätzen adhärierende LSEC-*Monolayer* mit in der unteren Transwell®-Kammer vorhandenem fluorochrommarkiertem CXCL12 für verschiedene Zeiträume bei 37°C und 4°C inkubiert und daraufhin mittels konfokaler Laser-*Scanning*-Mikroskopie analysiert. Es wurde eine zeitabhängige, basolaterale Internalisierung von CXCL12 in LSEC bei 37°C nachgewiesen, die wiederum nach einer Chemokininkubation bei 4°C inhibiert war (Abb. 19B).

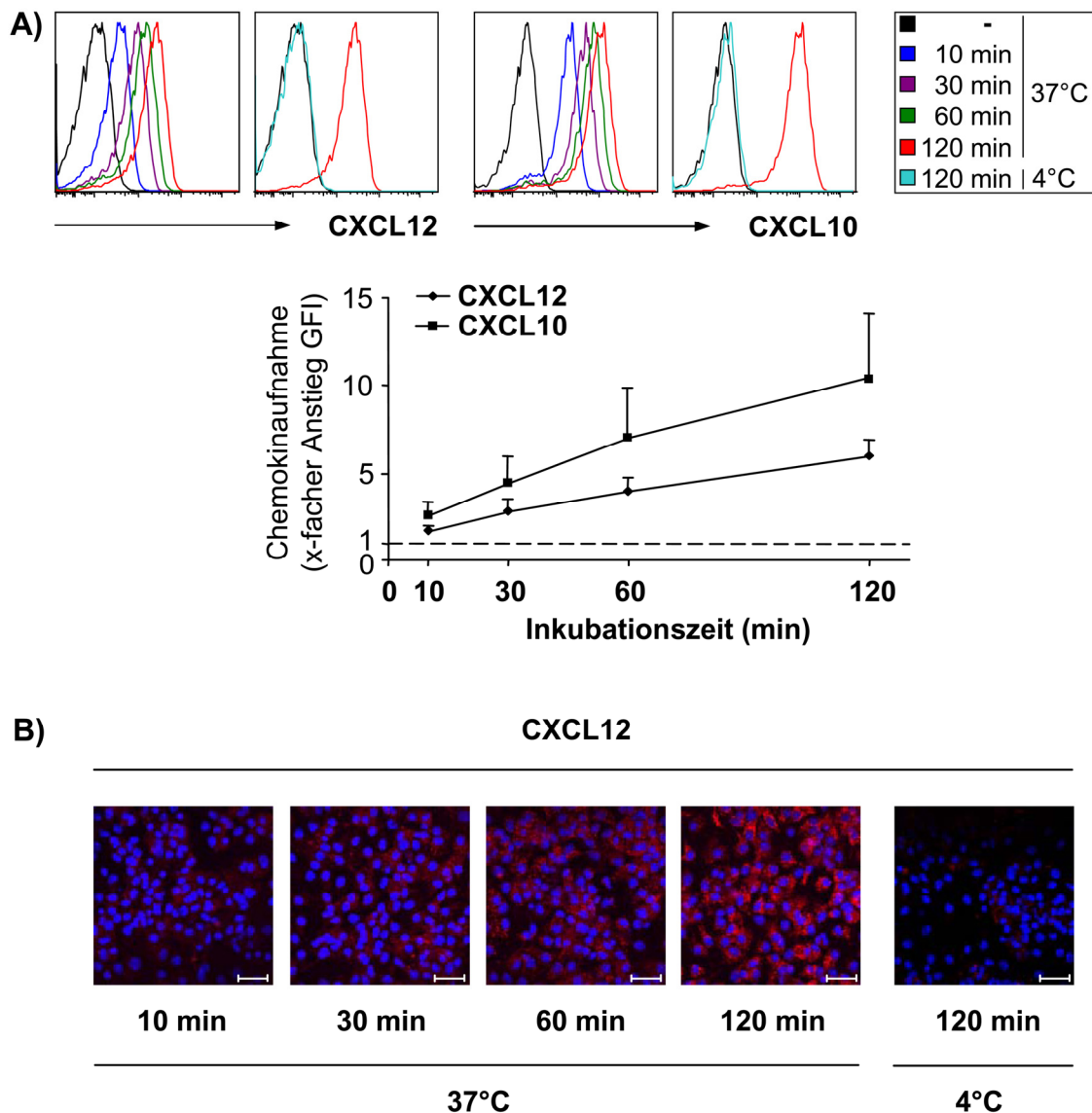


Abb. 19. Internalisierung der Chemokine CXCL12 und CXCL10 in LSEC. (A) Auf Zellkulturplatten adhärierende LSEC-Monolayer wurden mit AlexaFluor 647-markiertem CXCL12 oder CXCL10 für unterschiedliche Zeiträume bei 37°C oder 4°C inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer analysiert. Die Histogramme zeigen jeweils ein repräsentatives Experiment. Die unterschiedlichen Farben markieren verschiedene Inkubationszeiten und Temperaturen. Das Diagramm zeigt die Chemokinaufnahme als x-fachen Anstieg des GFI von LSEC, die mit den Chemokinen inkubiert wurden, bezogen auf den GFI von LSEC ohne Chemokininkubation. Die gestrichelte Linie markiert die Chemokinaufnahme bei 4°C. Der GFI nach Chemokininkubation entsprach dabei der Basislinie ohne Chemokininkubation. MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten. (B) LSEC-Monolayer wurden auf Transwell®-Filtereinsätzen kultiviert und für verschiedene Zeiträume mit in der unteren Transwell®-Kammer vorhandenem CXCL12-AlexaFluor 647 bei 37°C oder 4°C inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Das durch LSEC aufgenommene CXCL12 wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert. Der Standard repräsentiert 20 μ m. Repräsentatives Ergebnis aus 4 unabhängigen Experimenten.

Chemokine sind Liganden von Chemokinrezeptoren, weshalb untersucht wurde, ob LSEC die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR3 zur Internalisierung der entsprechenden Liganden CXCL12 bzw. CXCL10 nutzen.

Um eine Beteiligung von CXCR4 an der Aufnahme von CXCL12 in LSEC zu untersuchen, wurden auf Zellkulturplatten adhärierende LSEC-*Monolayer* mit dem spezifischen CXCR4-Antagonisten AMD 3100 vorinkubiert. Daraufhin wurden die LSEC-*Monolayer* mit CXCL12 inkubiert und die Internalisierung des Chemokins am Durchflusszytometer analysiert. Die Aufnahme von CXCL12 in AMD 3100-behandelte LSEC war im Vergleich zu unbehandelten LSEC signifikant reduziert (Abb. 20A).

Zur Analyse des Einflusses von CXCR4 auf die basolaterale Aufnahme von Chemokinen in LSEC wurden auf Transwell®-Filtereinsätzen adhärierende LSEC-*Monolayer* mit in der unteren Transwell®-Kammer vorhandenem AMD 3100 vorinkubiert. Nach der anschließenden Inkubation der LSEC-*Monolayer* von der Unterseite mit fluorchrommarkiertem CXCL12 wurde die Internalisierung des Chemokins am konfokalen Laser-*Scanning*-Mikroskop analysiert. Die basolaterale Aufnahme von CXCL12 in LSEC wurde durch die Vorbehandlung der Endothelzellen mit AMD 3100 inhibiert (Abb. 20B).

Unter Verwendung von LSEC aus CXCR3^{-/-}-Mäusen wurde die Beteiligung dieses Chemokinrezeptors an der Aufnahme von CXCL10 in LSEC analysiert. CXCR3^{-/-}-LSEC nahmen zeit- und temperaturabhängig gleich viel CXCL10 wie LSEC aus WT-Mäusen auf (Abb. 20C).

Die Ergebnisse zeigen, dass LSEC Chemokine aufnehmen. Die Internalisierung des homöostatischen Chemokins CXCL12 erfolgte mittels des Chemokinrezeptors CXCR4, während das inflammatorische Chemokin CXCL10 unabhängig von CXCR3 in LSEC aufgenommen wurde.

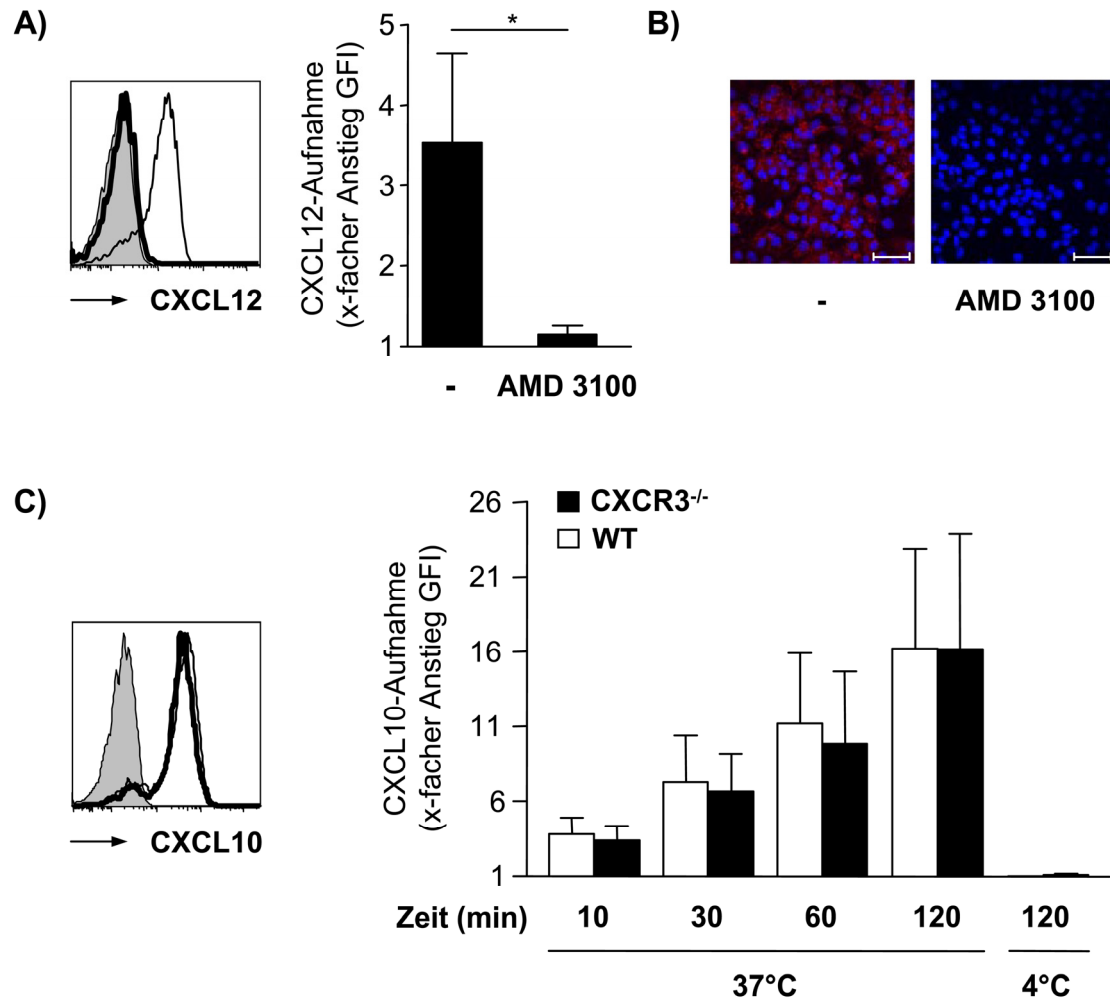


Abb. 20. Einfluss der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR3 auf die Aufnahme ihrer Liganden CXCL12 bzw. CXCL10 in LSEC. (A) Auf Zellkulturplatten adhärierende LSEC-Monolayer wurden mit AMD 3100 behandelt und dann mit CXCL12-AlexaFluor 647 inkubiert. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer. Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, ohne Chemokininkubation; schmale Linie, kein AMD 3100; verstärkte Linie, Vorbehandlung mit AMD 3100. Das Diagramm zeigt den x-fachen Anstieg des GFI von LSEC, die mit CXCL12 inkubiert wurden, im Verhältnis zum GFI von LSEC ohne Chemokininkubation. MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test. (B) Auf Transwell®-Filtereinsätzen adhärierende LSEC-Monolayer wurden mit in der unteren Kammer vorhandenem AMD 3100 vorbehandelt und anschließend mit CXCL12-AlexaFluor 647 basolateral inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Das durch LSEC aufgenommene CXCL12 wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert. Der Standard repräsentiert 20 μ m. Repräsentatives Experiment aus 4 unabhängigen Experimenten. (C) Auf Zellkulturplatten adhärierende CXCR3^{-/-}-LSEC- oder WT-LSEC-Monolayer wurden mit AlexaFluor 647-markiertem CXCL10 für unterschiedliche Zeiträume bei 37°C oder 4°C inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert. Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, ohne Chemokininkubation; schmale Linie, WT-LSEC; verstärkte Linie, CXCR3^{-/-}-LSEC. Gezeigt ist der x-fache Anstieg des GFI von LSEC, die mit CXCL10 inkubiert wurden, im Verhältnis zum GFI von LSEC ohne Chemokininkubation. MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten.

4.3.2 Caveolae- und Clathrin-vermittelte Chemokinbereitstellung durch LSEC

Die Aufnahme von Proteinen in Zellen erfolgt hauptsächlich durch Clathrin-vermittelte Endozytose oder mittels Caveolae-Vesikel. Deshalb wurde untersucht, welche Rolle beide *Pathways* bei der Internalisierung von Chemokinen in LSEC spielen.

Um eine Beteiligung von Caveolae-Vesikel an der Aufnahme von Chemokinen in LSEC zu untersuchen, wurden auf Zellkulturplatten adhärierende LSEC-*Monolayer* mit den Caveolae-spezifischen Inhibitoren Nystatin oder Filipin behandelt, bevor die Zellen mit fluorochrommarkiertem CXCL12 oder CXCL10 inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer analysiert wurden. Im Vergleich zu unbehandelten LSEC war die Chemokinaufnahme in mit den Caveolae-Inhibitoren vorbehandelten LSEC nicht verändert (Abb. 21A). Die basolaterale Aufnahme von CXCL12 war nach Vorbehandlung der Unterseite der auf Transwell®-Filtereinsätzen adhärierenden LSEC-*Monolayer* mit Nystatin oder Filipin ebenfalls unverändert (Abb. 21B). Des Weiteren wurde nach basolateraler Inkubation von LSEC-*Monolayer* mit CXCL12 keine Kolokalisation von internalisiertem Chemokin mit dem von LSEC exprimierten Hüllprotein Caveolin-1 nachgewiesen (Abb. 21C).

Die Aufnahme der Chemokine CXCL12 und CXCL10 in LSEC wurde somit durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit den Caveolae-Inhibitoren Nystatin oder Filipin nicht beeinflusst.

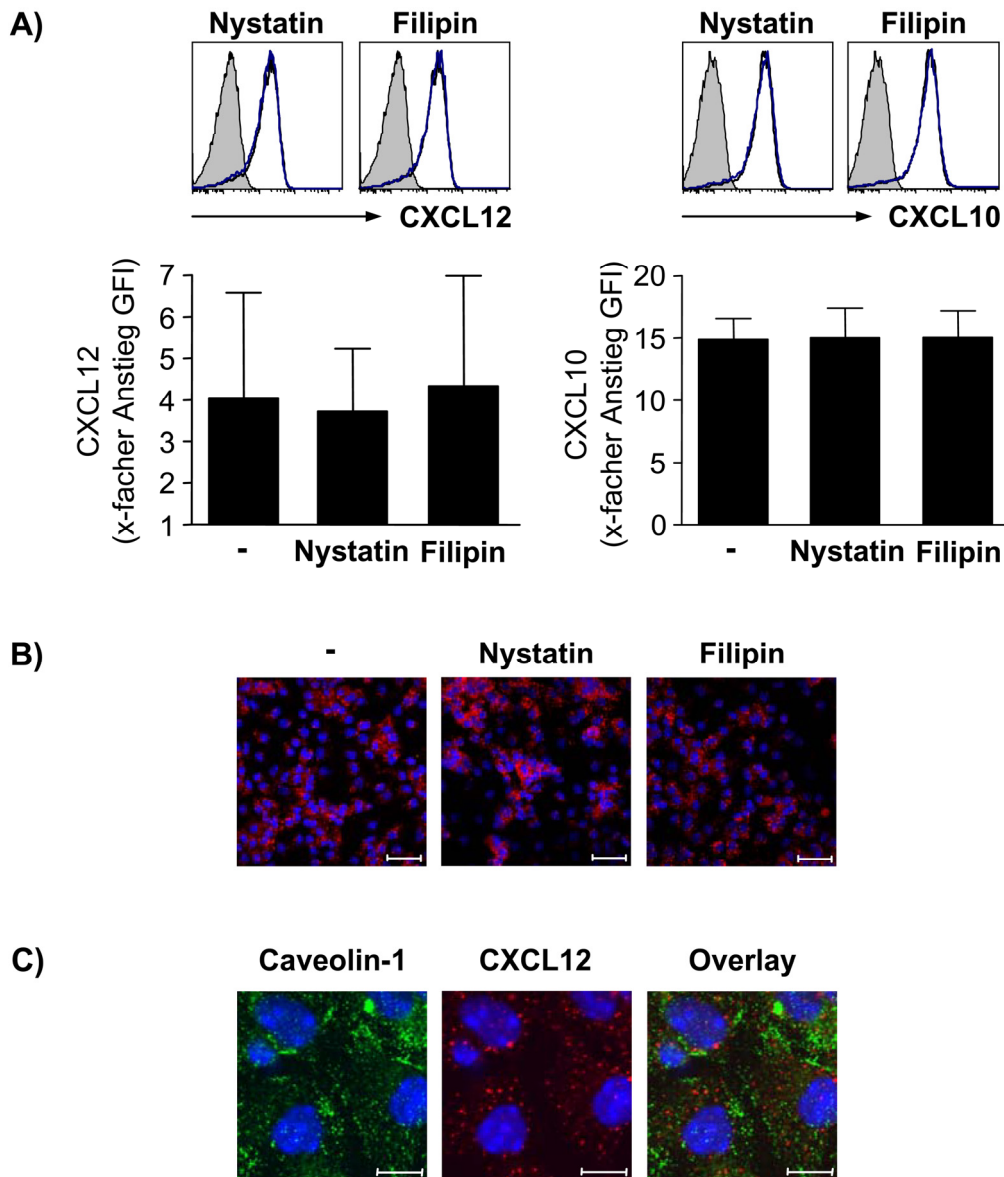


Abb. 21. Einfluss der Caveolae-vermittelten Chemokinaufnahme in LSEC. (A) LSEC-Monolayer wurden mit Nystatin oder Filipin vorbehandelt, mit AlexaFluor 647-CXCL12 oder -CXCL10 inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert. Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, ohne Chemokininkubation; schwarze Linie, kein Caveolae-Inhibitor; blaue Linie, Vorbehandlung mit Caveolae-Inhibitor. Die Diagramme zeigen den x-fachen Anstieg des GFI von LSEC, die mit Chemokin inkubiert wurden, im Verhältnis zum GFI von LSEC ohne Chemokininkubation. MW \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. (B) Auf Transwell®-Einsätzen adhätierende LSEC-Monolayer wurden mit in der unteren Kammer vorhandenem Nystatin oder Filipin vorbehandelt. Dann wurden die LSEC mit CXCL12-AlexaFluor 647 basolateral inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Chemokinaufnahme wurde mittels Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Der Standard repräsentiert 20 μ m. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Auf Transwell®-Filtereinsätzen adhätierende LSEC wurden basolateral mit CXCL12-AlexaFluor 647 inkubiert. Die fixierten Zellen wurden mit einem anti-Caveolin-1 Antikörper markiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Der Standard repräsentiert 5 μ m. Repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zur Analyse des Einflusses der Clathrin-abhängigen Endozytose auf die Internalisierung von Chemokinen durch LSEC wurden LSEC-*Monolayer* vor der Chemokininkubation mit dem spezifischen Clathrin-Inhibitor Chlorpromazin (CPZ) behandelt. Die Aufnahme der Chemokine CXCL12 und CXCL10 in LSEC war nach Vorbehandlung der Endothelzellen mit CPZ signifikant reduziert (Abb. 22A). Da CXCL10 von LSEC aus CXCR3^{-/-}-Mäusen internalisiert wurde (Abb. 20C), war ebenfalls von Interesse, ob die Chemokinaufnahme in CXCR3^{-/-}-LSEC durch Clathrin-vermittelte Endozytose erfolgt. CPZ-behandelte CXCR3^{-/-}-LSEC nahmen wie WT-LSEC signifikant weniger CXCL10 im Vergleich zu unbehandelten Endothelzellen auf (Abb. 22A). Die basolaterale Internalisierung von CXCL12 in LSEC war nach Vorbehandlung der Unterseite von LSEC-*Monolayer* mit CPZ inhibiert (Abb. 22B). Weiterhin wurde eine Kolo-kalisation von durch LSEC basolateral internalisiertem CXCL12 mit dem Hüllprotein Clathrin gezeigt (Abb. 22C).

Die Ergebnisse belegen die Aufnahme von Chemokinen in LSEC durch Clathrin-vermittelte Endozytose.

Weiterführend wurde untersucht, ob eine Inhibition dieses *Pathway* in LSEC Auswirkungen auf die Chemokinbereitstellung mittels Transzytose durch das Lebersinusendothel und damit letztendlich auf die chemokinabhängige Transmigration von T-Zellen durch das Endothel hat. Dazu wurden Transmigrationsassays durchgeführt. Auf Transwell®-Filtereinsätze adhärierende LSEC-*Monolayer* wurden von der Unterseite mit CPZ behandelt und anschließend basolateral mit den Chemokinen CXCL12, CXCL9 oder CXCL10 inkubiert. Nach Entfernung der Chemokine aus der unteren Transwell®-Kammer wurde die chemokinabhängige Transmigration von apikal auf dem Endothel liegenden CD4⁺ T-Zellen durch die LSEC-*Monolayer* analysiert.

Alle CD4⁺ T-Zellen exprimieren CXCR4 und reagieren chemotaktisch auf das homöostatische Chemokin CXCL12, während nur CXCR3-exprimierende Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen auf die inflammatorischen Chemokine CXCL9 und CXCL10 reagieren (Bonecchi, et al., 1998; Sallusto, et al., 1998). Die transmigrierten CD4⁺ T-Zellen wurden daher mit einem anti-CD45RB Antikörper markiert, um Effektor/*Memory* CD4⁺CD45RB^{low} T-Zellen zu identifizieren.

Nach basolateraler Inkubation von LSEC-*Monolayer* mit den verschiedenen Chemokinen erhöhte sich die CXCL12-abhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen sowie die CXCL9- und CXCL10-abhängige Transmigration von Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen durch das Endothel signifikant (Abb. 22D).

Die Behandlung der Unterseite von LSEC-*Monolayer* mit CPZ vor der Inkubation mit den Chemokinen führte im Vergleich zu unbehandelten LSEC zu einer signifikant verringerten CXCL12-abhängigen Transmigration von CD4⁺ T-Zellen. Die CXCL9- und CXCL10-abhängige Transmigration von Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen durch CPZ-behandelte LSEC-*Monolayer* war ebenfalls signifikant reduziert (Abb. 21E).

Somit führte die Behandlung der LSEC mit dem Clathrin-Inhibitor CPZ zu einer verringerten chemokinabhängigen Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch das Endothel.

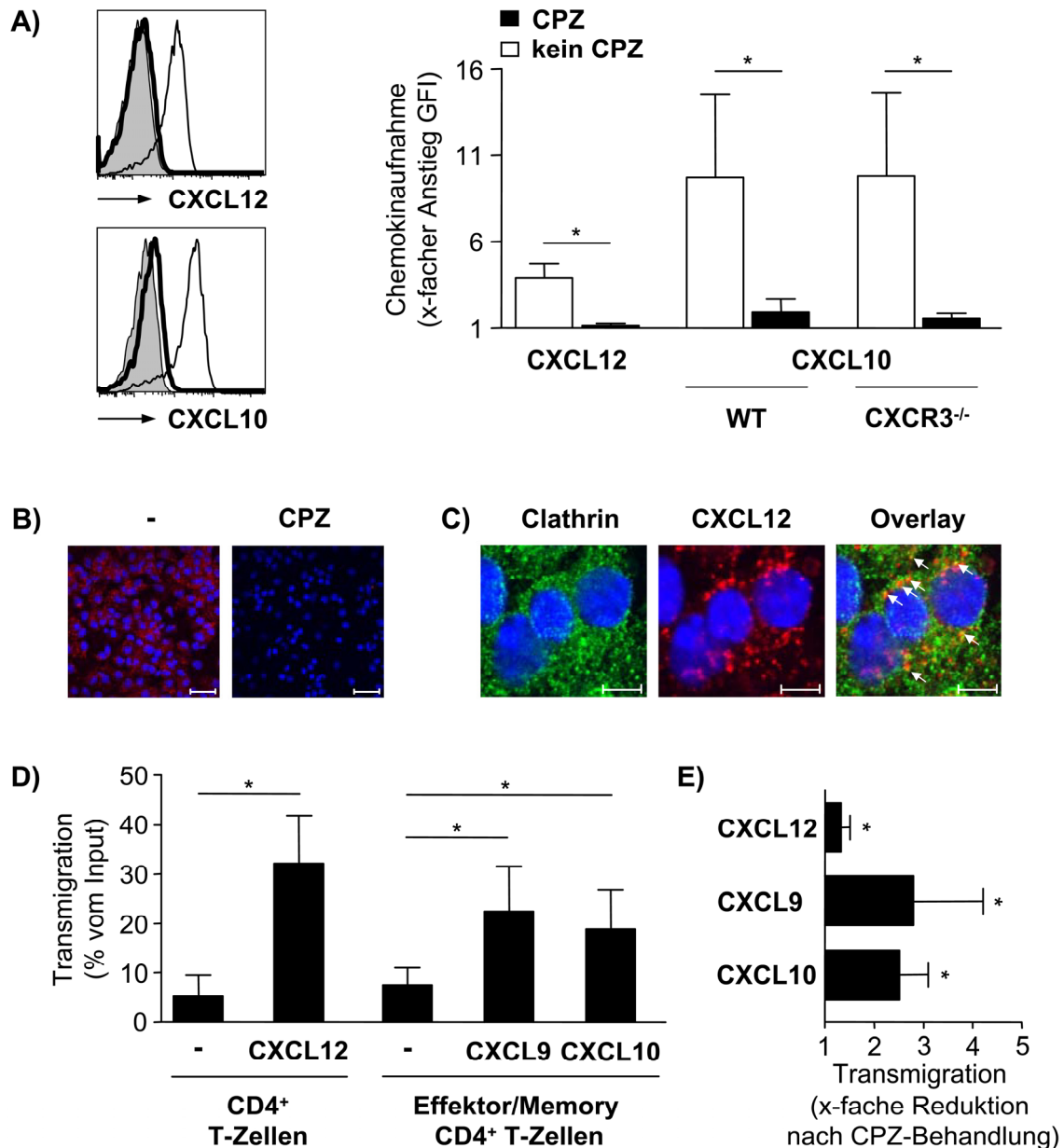


Abb. 22. Einfluss der Clathrin-vermittelten Endozytose auf die Chemokinbereitstellung durch LSEC. (A) WT- oder CXCR3^{-/-}-LSEC-Monolayer wurden mit CPZ vorbehandelt, mit AlexaFluor 647-markiertem CXCL12 oder CXCL10 inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment. Ausgefüllte Kurve, ohne Chemokininkubation; schmale Linie, kein CPZ; verstärkte Linie, Vorbehandlung mit CPZ. Das Diagramm zeigt den x-fachen Anstiegs des GFI von LSEC, die mit Chemokin inkubiert wurden, im Verhältnis zum GFI von LSEC ohne Chemokininkubation. MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test. (B) Auf Transwell®-Einsätzen adhärierende LSEC-Monolayer wurden von der Unterseite mit CPZ vorbehandelt und dann mit in der unteren Kammer vorhandenem CXCL12-AlexaFluor 647 inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Das durch LSEC aufgenommene CXCL12 wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie visualisiert. Der Standard repräsentiert 20 μ m. Repräsentatives Ergebnis aus 4 unabhängigen Experimenten. (C) LSEC-Monolayer wurden von der Unterseite mit CXCL12-Alexa Fluor 647 inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurden diese mit einem anti-Clathrin Antikörper markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die

Pfeile zeigen Kollokalisierungen zwischen CXCL12 und Clathrin. Der Standard repräsentiert 5 μm . Repräsentatives Ergebnis aus 4 unabhängigen Experimenten. (D) LSEC-*Monolayer* wurden mit in der unteren Transwell®-Kammer vorhandenem CXCL12, CXCL9 oder CXCL10 inkubiert. Nach Wegnahme der Chemokine wurden CD4⁺ T-Zellen in die obere Transwell®-Kammer gegeben. Die Versuche wurden wie in Abb. 9 beschrieben durchgeführt. Die transmigrierten Zellen wurden mit einem anti-CD4 und anti-CD45RB Antikörper markiert. Dargestellt ist die Transmigrationsrate als % des *Inputs*. MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test. (E) LSEC-*Monolayer* wurden vor der basolateralen Chemokininkubation mit in der unteren Kammer vorhandenem CPZ behandelt. Dargestellt ist die x-fache Reduktion der chemokinabhängigen Transmigration von CD4⁺ T-Zellen oder Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen durch CPZ-behandelte LSEC-*Monolayer* im Verhältnis zur Transmigration durch unbehandelte LSEC-*Monolayer*. MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; *One-Sample t*-Test.

4.3.3 Immobilisierung von Chemokinen durch LSEC

Grundsätzlich können Chemokine durch GAG auf der Zelloberfläche von Endothelzellen immobilisiert werden. Um zu klären, ob LSEC die Proteoglykane Heparansulfat und Chondroitinsulfat zur apikalen Chemokinbereitstellung nutzen, wurde die Oberseite der LSEC-*Monolayer* mit spezifischen Enzymen, welche die für die Immobilisierung von Chemokinen notwendigen negativ geladenen Sulfatgruppen der GAG abspalten, vorbehandelt. Nach der anschließenden basolateralen Inkubation der LSEC-*Monolayer* mit den Chemokinen CXCL12 oder CXCL9 wurde die chemokinabhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen mittels Transmigrationsassays untersucht. Die CXCL12-abhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration war sowohl nach apikaler Vorbehandlung der LSEC mit Heparinase I als auch mit Chondroitinase gegenüber der Transmigrationsrate durch unbehandelte LSEC-*Monolayer* signifikant reduziert. Die CXCL9-abhängige Transmigration von Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen war ebenfalls nach Behandlung der LSEC-*Monolayer* mit Heparinase I oder Chondroitinase signifikant verringert. (Abb. 23).

Somit war nach Behandlung der LSEC mit GAG-modifizierenden Enzymen die chemokinabhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen vermindert.

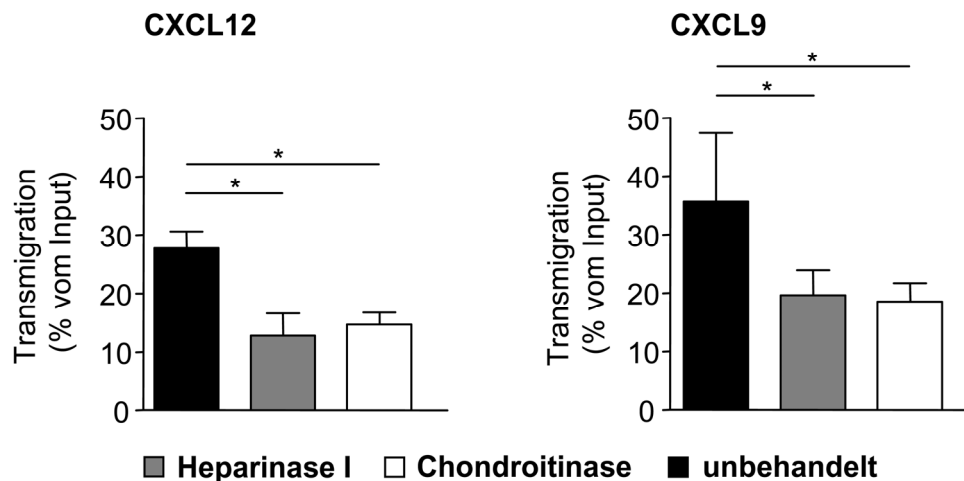


Abb. 23. Immobilisierung von Chemokinen durch LSEC mittels GAG. Auf Transwell®-Filtereinsätzen adhärierende LSEC-Monolayer wurden mit in der oberen Kammer vorhandener Heparinase I oder Chondroitinase vorbehandelt. Nach basolateraler Inkubation mit CXCL12 oder CXCL9 wurden CD4⁺ T-Zellen in die obere Transwell®-Kammer gegeben und die Versuche wie in Abb. 9 beschrieben durchgeführt. Die transmigrierten Zellen wurden mit einem anti-CD4 und anti-CD45RB Antikörper markiert. Dargestellt ist die Transmigrationsrate als % des Inputs. MW ± SD von 4 unabhängigen Experimenten. * = p < 0,05; Mann-Whitney-Test.

4.4 Chemokinbereitstellung durch das Lebersinusendothel als therapeutisches Target in einer Autoimmunhepatitis

Eine Autoimmunhepatitis (AIH) ist gekennzeichnet durch den Verlust der Toleranz gegenüber der eigenen Leber. Patienten mit AIH zeigen eine signifikant erhöhte T-Zell-Reaktivität gegenüber Autoantigenen der Leber, die vor allem über MHC-II präsentiert werden. Während einer AIH in die Leber einwandernde T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Schädigung des Lebergewebes und der Nekrosebildung. So exprimieren durch die Präsentation von Autoantigenen aktivierte CD4⁺ T-Zellen das proinflammatorische Zytokin TNF α , das wiederum die Expansion von zytotoxischen T-Zellen verstärkt. Des Weiteren stimulieren aktivierte CD4⁺ T-Zellen durch die Expression von IL-4 und IL-10 die Produktion von gegen Zellmembranbestandteile von Hepatozyten gerichtete Autoantikörper durch Plasmazellen (Czaja, 1995; Diamantis and Boumpas, 2004).

Eine Möglichkeit zur Behandlung einer AIH könnte die Reduktion der Einwanderung von T-Zellen in das Lebergewebe sein. Da die Chemokinbereitstellung durch das Lebersinusendothel eine Voraussetzung für die Extravasation von T-Zellen aus dem Blutstrom in das Lebergewebe ist, wäre deren Beeinflussung ein potenzieller therapeutischer Ansatz zur Suppression einer AIH. Deshalb wurde im vierten Teil dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob während einer AIH inflammatorische Chemokine eine Rolle bei der Rekrutierung von T-Zellen in das Lebergewebe spielen und welchen therapeutischen Nutzen Eingriffe in die zugrunde liegenden Mechanismen der endothelialen Chemokinbereitstellung *in vivo* auf den Verlauf einer AIH haben.

4.4.1 Expression inflammatorischer Chemokine in der Leber während einer Con A-induzierten Autoimmunhepatitis (AIH)

Die Bedeutung inflammatorischer Chemokine für die Akkumulation von Effektor T-Zellen in der Leber ist in verschiedenen Modellen der Leberentzündung und Transplantatabstoßung gezeigt worden (Arai, et al., 2002; Hancock, et al., 2000; Khan, et al., 2000). Um zu klären, ob Chemokine auch eine Rolle bei der AIH spielen, wurde basierend auf der Con A-induzierten Hepatitis, dem Modell einer T-Zell-vermittelten AIH, die entzündungsinduzierte Expression inflammatorischer Chemokine in den Zellen des Lebergewebes untersucht. Von besonderem Interesse war der Nachweis inflammatorischer Chemokine in LSEC.

Vorversuche hatten einen transienten Verlauf der Con A-induzierten AIH mit höchster ALT-Aktivität 8 h bis 12 h nach Induktion der Hepatitis gezeigt (Abb. 8). Um eine Aussage bezüglich der mRNA-Expression inflammatorischer Chemokine auf dem Höhepunkt der AIH treffen zu können, wurde C57BL/6 Mäusen zum Auslösen der AIH i.v. Con A gespritzt und 8 h nach Con A-Gabe die Lebern zur Analyse entnommen.

Mittels TaqMan®-*real-time*-PCR wurde die relative mRNA-Expression der inflammatorischen Chemokine CXCL9 und CXCL10 sowie des homöostatischen Chemokins CXCL12 im Verhältnis zu GAPDH ermittelt. Im Vergleich zum Lebergewebe gesunder Tiere war die mRNA-Expression von CXCL9 und CXCL10 im Lebergewebe Con A-behandelter Tiere signifikant erhöht, die mRNA-Expression von CXCL12 dagegen signifikant verringert (Abb. 24A).

Um zu ermitteln, ob das Protein des inflammatorischen Chemokins CXCL9 unter entzündlichen Bedingungen in LSEC vorhanden ist, wurden 12 h nach Con A-Gabe die Lebern entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und diese mit einem anti-CD146 und anti-CXCL9 Antikörper gefärbt. Es wurden Kolo-kalisationen zwischen sinusoidal exprimiertem CD146 und CXCL9 gezeigt (Abb. 24B).

Die hepatische Expression inflammatorischer Chemokine stieg somit während einer Con A-induzierten AIH sehr stark an und CXCL9 wurde in LSEC nachgewiesen.

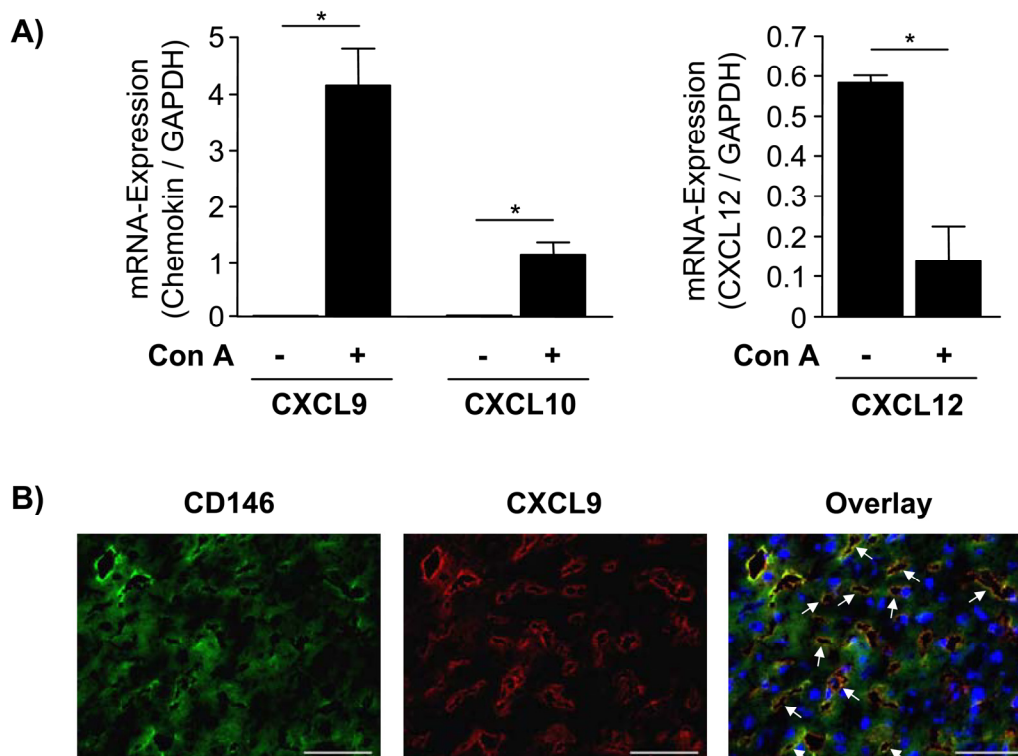


Abb. 24. Hepatische Expression inflammatorischer Chemokine während einer Con A-induzierten AIH. (A) C57BL/6 Mäusen wurde 8 h nach i.v. Con A-Gabe die Leber entnommen, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Die relative mRNA-Expression der Chemokine wurde mittels TaqMan[®]-*real-time*-PCR im Verhältnis zur Expression von GAPDH ermittelt. MW \pm SD von jeweils 4 Tieren. * = $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test. (B) Gefrierschnitte des Lebergewebes, entnommen 12 h nach Con A-Gabe, wurden mit einem anti-CD146 und einem anti-CXCL9 Antikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Pfeile zeigen Kolokalisationen zwischen sinusoidal lokalisiertem CD146 und CXCL9. Der Standard repräsentiert 50 μ m. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit 4-5 Mäusen pro Gruppe.

4.4.2 Verlauf einer Con A-induzierten AIH nach Gabe von CPZ

Im Abschnitt 4.3.2 wurde gezeigt, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose eine wichtige Rolle bei der Chemokinbereitstellung durch das Lebersinusendothel spielt. Nach Inhibition des Clathrin-*Pathway* in LSEC *in vitro* war die chemokinabhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch das Endothel reduziert. Darauf aufbauend wurde untersucht, ob die Gabe des Clathrin-Inhibitors CPZ *in vivo* den Verlauf einer AIH und die Rekrutierung von T-Zellen in das Lebergewebe beeinflusst.

Um den Verlauf und das Ausmaß einer Con A-induzierten AIH festzustellen, wurden zu einem frühen Zeitpunkt (3 h nach Induktion) sowie zum Höhepunkt der AIH (12 h nach Induktion) die ALT-Aktivität im Plasma bestimmt und das Lebergewebe histologisch analysiert. Dabei wurde der Score ermittelt sowie die Akkumulation von T-Zellen im Lebergewebe untersucht.

Zum Auslösen der AIH erhielten C57BL/6 Mäuse i.v. Con A. Einer Gruppe wurde nach der Con A-Gabe CPZ i.p. verabreicht. Verglichen mit unbehandelten Tieren (ALT: $28,0 \pm 11,6$ U/l; Median \pm SD; $n = 15$ Tiere) war 3 h nach Con A-Gabe kein signifikanter Anstieg der ALT-Aktivität im Plasma Con A-behandelter Mäuse nachweisbar. Dagegen war die ALT-Aktivität 12 h nach Con A-Gabe signifikant erhöht (Abb. 25A). Im Plasma von Tieren, die nach Induktion der AIH CPZ erhalten hatten, war die ALT-Aktivität 3 h nach Gabe von Con A vergleichbar mit der von Tieren, die

kein CPZ erhalten hatten. Im Gegensatz dazu war die ALT-Aktivität CPZ-behandelter Tiere 12 h nach Induktion der AIH signifikant reduziert (Abb. 25A).

Die histologische Analyse zeigte 3 h nach Con A-Gabe keine Nekrosen und nur geringe Zellinfiltrate im Lebergewebe von Con A-behandelten Mäusen. Der daraus resultierende *Score* war gegenüber dem gesunder Tiere ($1,0 \pm 0,6$; Median \pm SD; n = 15 Tiere) nicht signifikant erhöht. Nach CPZ-Gabe waren keine Nekrosen oder Zellinfiltrate zu beobachten (Abb. 25B). Ausgeprägte Nekrosen und Infiltrationen mononukleärer Zellen wurden im Lebergewebe von Con A-behandelten Mäusen 12 h nach Induktion der AIH nachgewiesen und der *Score* war dementsprechend signifikant erhöht. Nach Verabreichung von CPZ kam es weder zu einer starken Nekrosebildung noch zu erhöhten Zellinfiltrationen. Der *Score* war gegenüber dem von Tieren, die kein CPZ erhalten hatten, signifikant verringert (Abb. 25B).

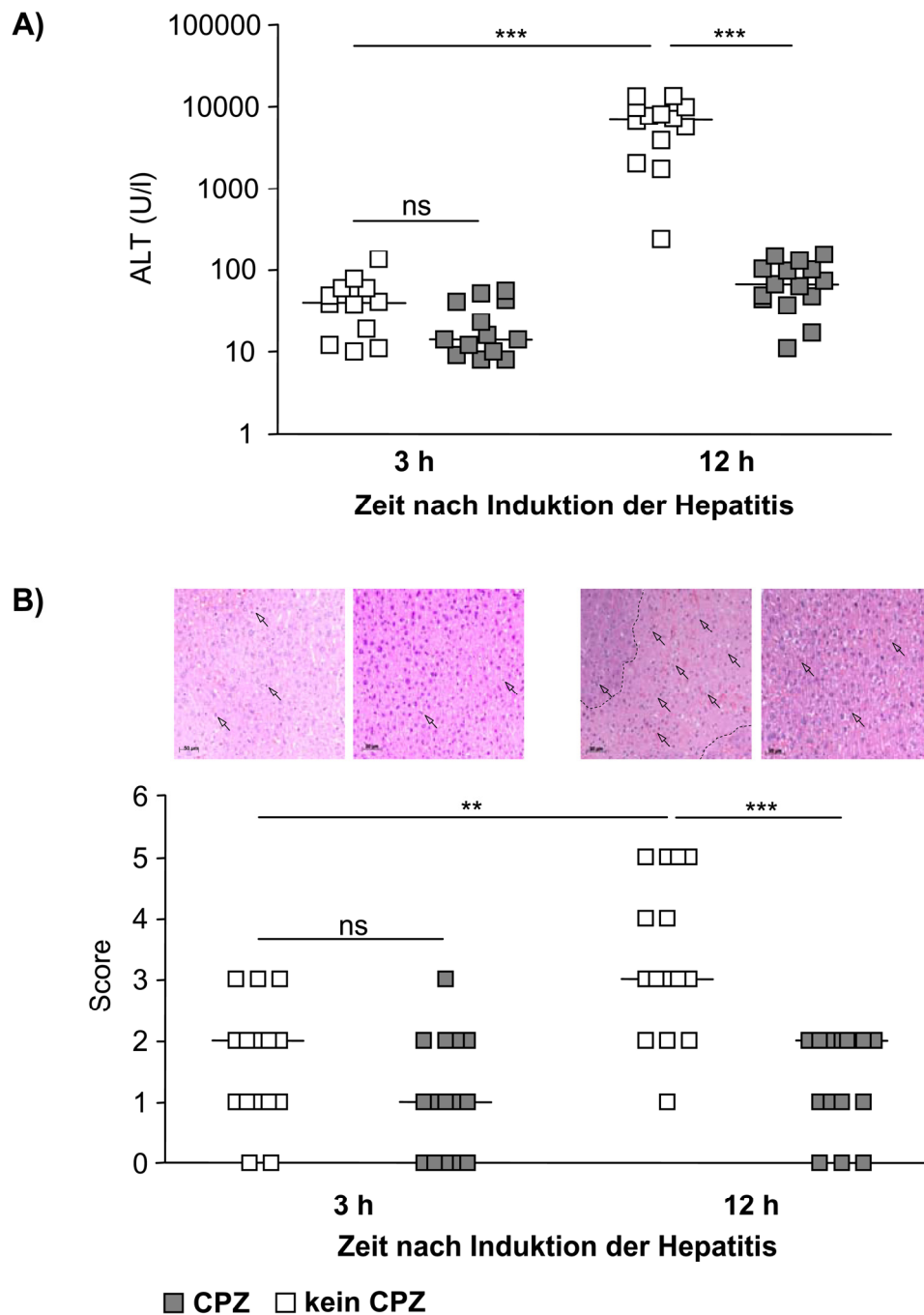


Abb. 25. Verlauf der Con A-induzierten AIH nach Gabe des Clathrin-Inhibitors CPZ. C57BL/6 Mäuse erhielten i.v. Con A und 1 h nach Induktion der AIH i.p. CPZ. (A) Plasma-ALT-Aktivitäten wurden 3 h und 12 h nach Induktion der AIH bestimmt. (B) Dünnschnitte vom Lebergewebe wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und nekrotische Bereiche (gestrichelte Linie) sowie Infiltrationen mononukleärer Zellen (Pfeile) lichtmikroskopisch visualisiert. Die Abbildungen zeigen repräsentative histologische Bilder und Mediane der ALT-Aktivitäten bzw. Scores von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 4-5 Mäusen pro Gruppe. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

Um die Akkumulation von T-Zellen im Lebergewebe während einer Con A-induzierten AIH zu untersuchen, wurde die Anzahl $CD3^+$ T-Zellen in Dünnschnitten vom Lebergewebe bestimmt. Dabei war 3 h nach Con A-Gabe die Anzahl der $CD3^+$ T-Zellen im Vergleich zum Lebergewebe gesunder Tiere ($CD3^+/\text{HPF}$: $4,7 \pm 3,9$; Median \pm SD; $n = 10$ Tiere) nicht erhöht. Durch CPZ-Gabe wurde die Anzahl der $CD3^+$ T-Zellen nicht verändert. Im Gegensatz dazu war eine signifikant erhöhte Anzahl $CD3^+$ T-Zellen im Lebergewebe und eine Akkumulation der Zellen um die Portalfelder 12 h nach Induktion der Hepatitis nachweisbar. Nach Gabe von CPZ war die Anzahl $CD3^+$ T-Zellen im Lebergewebe signifikant reduziert (Abb. 26).

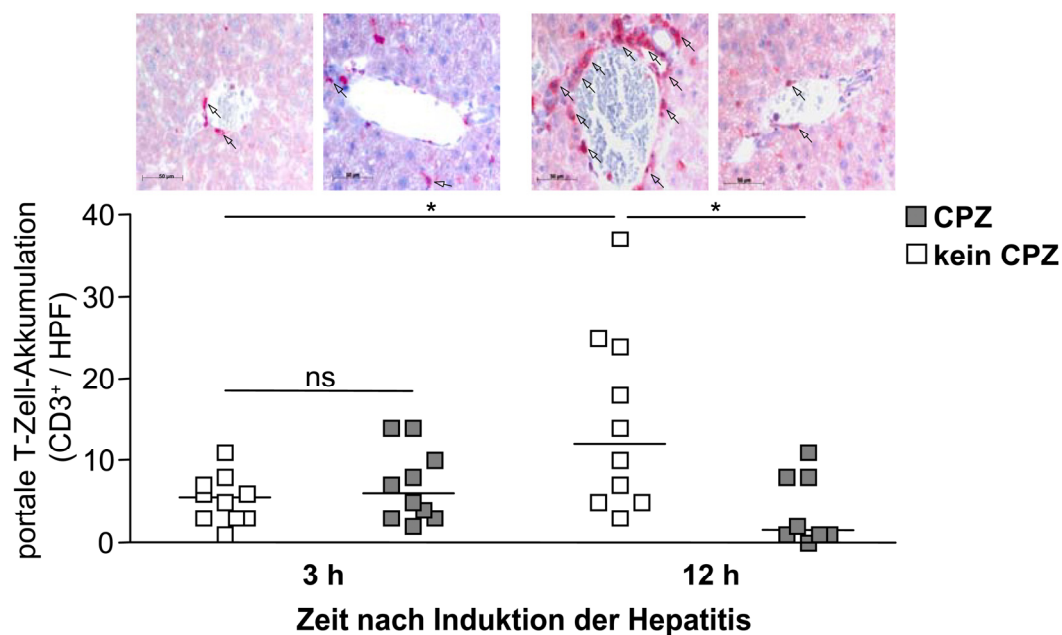


Abb. 26. Akkumulation endogener T-Zellen im Lebergewebe während der Con A-induzierten AIH und nach Gabe von CPZ. C57BL/6 Mäuse erhielten i.v. Con A und 1 h später wurde CPZ i.p. verabreicht. Die Lebern wurden 3 h und 12 h nach Induktion der AIH entnommen. Paraffinschnitte des Lebergewebes wurden mit einem anti-CD3 Antikörper gefärbt sowie einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Dargestellt ist die Anzahl $CD3^+$ T-Zellen pro HPF. Die Pfeile markieren $CD3^+$ T-Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentative histologische Bilder und Mediane von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 Mäusen pro Gruppe. * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

Zusammenfassend war nach Gabe des Clathrin-Inhibitors CPZ während einer Con A-induzierten AIH die Plasma-ALT-Aktivität, die Schädigung des Lebergewebes und die Akkumulation von T-Zellen im Lebergewebe reduziert.

4.4.3 T-Zellaktivierung und Akkumulation CXCR3⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Leber während einer Con A-induzierten AIH und nach Gabe von CPZ

Im Modell der Con A-induzierten AIH sind die Aktivierung lokaler T-Zellen sowie die Migration und Akkumulation aktivierter T-Zellen im Lebergewebe Voraussetzungen für die hepatische Entzündung. Daher wurde untersucht, welchen Effekt die Gabe von CPZ auf beide Faktoren hat, um mögliche Gründe für dessen suppressive Wirkung auf die Entwicklung einer T-Zell-vermittelten Hepatitis aufzuzeigen. Basierend auf der Erkenntnis, dass während einer Con A-induzierten AIH die hepatische Expression der inflammatorischen Chemokine CXCL9 und CXCL10 stark erhöht war, wurde die Akkumulation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen, die den entsprechenden Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren, im Lebergewebe untersucht.

Zur Analyse der T-Zellaktivierung wurde den Tieren 6 h nach Auslösen der Con A-induzierten AIH, zu einem Zeitpunkt, an dem erhöhte ALT-Aktivitäten im Plasma Con A-behandelter Mäuse nachweisbar waren (Abb. 8), die Lebern entnommen und NPC isoliert. Die Aktivierung der T-Zellen wurde über die Expressionshöhe des Aktivierungsmarkers CD69 am Durchflusszytometer ermittelt. Dabei wurde zum einen durch Markierung der NPC mit einem anti-CD90.2 Antikörper die Aktivierung aller T-Zellen untersucht, zum anderen war die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen während der Con A-induzierten AIH von besonderem Interesse, weshalb die NPC außerdem mit einem anti-CD4 Antikörper markiert wurden. Nach Con A-Gabe stieg die Expression von CD69 sowohl auf CD90.2⁺ T-Zellen als auch auf CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu

Zellen aus Con A-unbehandelten Mäusen (GFI: CD90.2⁺ T-Zellen: $62,4 \pm 43,4$; CD4⁺ T-Zellen: $59,1 \pm 56,3$; Median \pm SD; n = 9 Tiere) stark an. Nach Gabe von CPZ war die Expressionshöhe von CD69 auf CD90.2⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen vergleichbar mit den Werten der Tiere, die nur Con A erhalten hatten (Abb. 27A).

Um den prozentualen Anteil CXCR3-exprimierender CD4⁺ T-Zellen im Lebergewebe zu ermitteln, wurden NPC 24 h nach Con A-Gabe isoliert, mit einem anti-CD4 und anti-CXCR3-Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Der prozentuale Anteil CXCR3⁺CD4⁺ T-Zellen im Lebergewebe Con A-behandelter Mäuse war im Vergleich zu Con A-unbehandelten Tieren signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu war nach Gabe des Clathrin-Inhibitors CPZ der Anteil CXCR3⁺CD4⁺ T-Zellen im Lebergewebe signifikant reduziert und lag auf dem Niveau Con A-unbehandelter Tiere (Abb. 27B).

Die i.v. Gabe von Con A führte somit zur Aktivierung endogener T-Zellen und Akkumulation CXCR3-exprimierender CD4⁺ T-Zellen im Lebergewebe. Nach Gabe des Clathrin-Inhibitors CPZ war die T-Zellaktivierung nicht verändert, jedoch der prozentuale Anteil CXCR3⁺CD4⁺ T-Zellen im Lebergewebe vermindert.

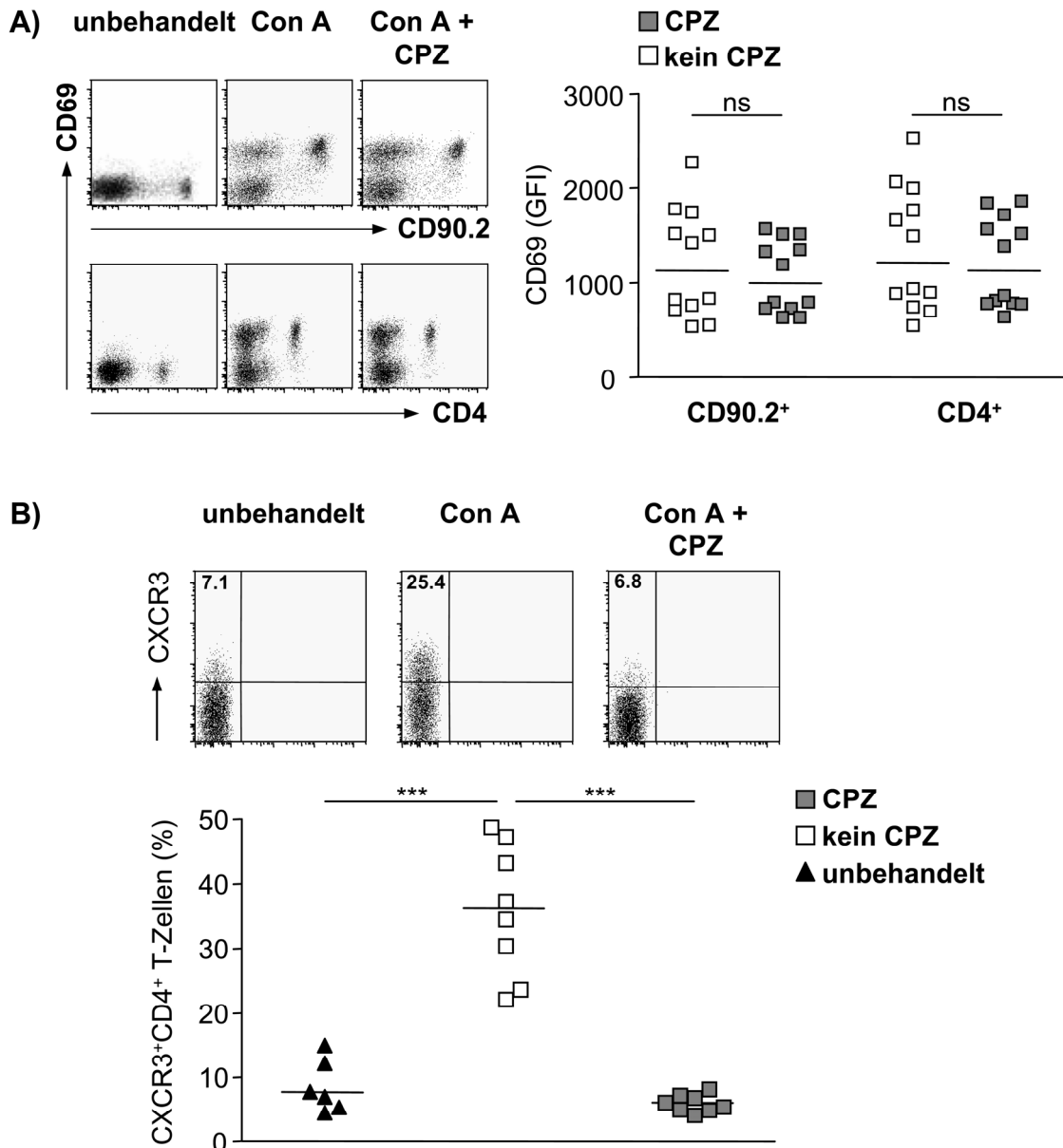


Abb. 27. Aktivierung endogener T-Zellen und Akkumulation CXCR3⁺ CD4⁺ T-Zellen während der Con A-induzierten AIH und nach Gabe von CPZ. C57BL/6 Mäuse erhielten i.v. Con A und 1 h nach Induktion der AIH i.p. CPZ. (A) NPC wurden 6 h nach Con A-Gabe isoliert, mit einem anti-CD90.2, anti-CD4 und anti-CD69 Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist der GFI von CD69, exprimiert auf CD90.2⁺ oder CD4⁺ T-Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentative *Dot Plots* und Mediane von 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Tieren pro Gruppe. (B) NPC wurden 24 h nach Con A-Gabe isoliert, mit einem anti-CXCR3 und anti-CD4 Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CXCR3⁺ Zellen, bezogen auf CD4⁺ T-Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentative *Dot Plots* und Mediane von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-4 Tieren pro Gruppe. *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant; Mann-Whitney-Test.

4.4.4 Einfluss von CPZ auf die Migration von CD4⁺ T-Zellen unter homöostatischen oder inflammatorischen Bedingungen in die Leber

Abschließend wurde untersucht, ob die nach Gabe von CPZ gezeigte verminderte Akkumulation von T-Zellen im Lebergewebe nur während einer Entzündung auftritt oder ob CPZ auch einen Einfluss auf die Migration von T-Zellen unter homöostatischen Bedingungen hat.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Versuchen wurde dabei nicht die hepatische Akkumulation endogener T-Zellen, sondern die Migration transferierter CD4⁺ T-Zellen in das Lebergewebe mittels *Homingassays* analysiert. Das CPZ wurde 7 h nach Con A-Gabe, zu einem Zeitpunkt als die AIH etabliert war, verabreicht. Unbehandelte Tiere erhielten ebenfalls CPZ. Der i.v. Transfer radioaktiv markierter CD4⁺ T-Zellen erfolgte in allen Tieren 2 h nach CPZ-Gabe. Nach 1 h wurden die Lebern entnommen und die darin enthaltene Radioaktivität im Vergleich zum restlichen Körper bestimmt. Nach Con A-Gabe stieg der prozentuale Anteil in die Leber migrierender CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant an. Nach Gabe von CPZ während der etablierten AIH verringerte sich der Anteil in die Leber migrierender CD4⁺ T-Zellen signifikant (Abb. 28A).

Der Anteil transferierter CD4⁺ T-Zellen in den Lebern von CPZ-behandelten Tieren, die kein Con A erhalten hatten, war verglichen mit unbehandelten Mäusen nicht signifikant verändert (Reduktion: $1,1 \pm 0,2$ fach, MW \pm SD; n = 7-11 Tiere). Im Vergleich dazu war nach Gabe von CPZ bei einer etablierten Con A-induzierten AIH der prozentuale Anteil in die Leber migrierender CD4⁺ T-Zellen signifikant reduziert (Abb. 28B).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Gabe von CPZ vor allem während einer Entzündung, weniger unter homöostatischen Bedingungen, Auswirkungen auf die Akkumulation und Migration von T-Zellen in das Lebergewebe hatte.

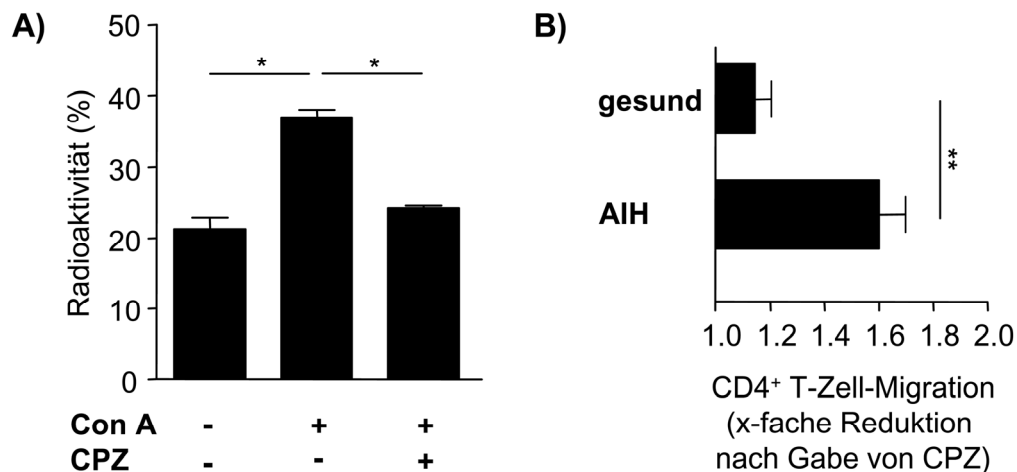


Abb. 28. Migration transferierter CD4⁺ T-Zellen in die Leber unter homöostatischen oder entzündlichen Bedingungen und nach Gabe von CPZ. C57BL/6 Mäuse erhielten i.v. Con A und 7 h später i.p. CPZ. Gesunden Tieren wurde ebenfalls CPZ verabreicht. Radioaktiv markierte CD4⁺ T-Zellen wurden 2 h nach CPZ-Gabe i.v. transferiert und nach 1 h wurde die leberspezifische Radioaktivität im Vergleich zur Radioaktivität des restlichen Körpers bestimmt. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil in der Leber nachgewiesener Radioaktivität bezogen auf die gesamte transferierte Radioaktivität. (B) Gezeigt ist die x-fache Reduktion der CD4⁺ T-Zellmigration in gesunde oder entzündete Lebern von CPZ-behandelten Mäusen, im Verhältnis zu Tieren, die jeweils kein CPZ erhalten hatten. MW \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2-3 Tieren pro Gruppe. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; Mann-Whitney-Test.

5 Diskussion

Immunantworten zur Bekämpfung von Infektionen und Entzündungen, aber auch Autoimmunerkrankungen werden durch die Rekrutierung von Effektorzellen in bestimmte Gewebe ausgelöst. Die Migration und Extravasation von T-Zellen wird dabei durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Bedeutung des Lebersinusendothels, als eine Population von nicht-professionellen APC der Leber, für die Regulation und Modulation der gewebespezifischen Migration von $CD4^+$ T-Zellen. Es wurden insbesondere die Einflüsse der endothelialen Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung sowie der Chemokinbereitstellung durch das Lebersinusendothel auf die Migration von $CD4^+$ T-Zellen untersucht.

5.1 Einfluss des Lebersinusendothels auf die antigenabhängige Rekrutierung von $CD4^+$ T-Zellen in das Lebergewebe

Die Migration antigenspezifischer Effektor/*Memory* T-Zellen in periphere Gewebe dient der Etablierung von Immunantworten, kann jedoch auch zur Autoimmunität, wie im Falle der Leber zur Entwicklung einer AIH (Czaja, 1995; Diamantis and Boumpas, 2004), führen. Interaktionen zwischen endothelialen Adhäsionsmolekülen sowie ihren von T-Zellen exprimierten Liganden führen zur festen Adhäsion von T-Zellen an Endothelien und stellen einen entscheidenden Schritt bei der Extravasation in sekundäre lymphatische Organe und periphere Gewebe dar (Boyd, et al., 1988; Chan and Aruffo, 1993; Dustin and Springer, 1988; Luscinskas, et al., 1995). Neben der Expression von *Homing*rezeptoren auf T-Zellen kann dabei eine zusätzliche Spezifität durch selektive Erkennung von Antigenen mittels des TCR und kostimulatorischer Moleküle erreicht werden, wenn die Antigene durch Endothelzellen des Gewebes, in

dem das Antigen lokalisiert ist, präsentiert werden (Ward and Marelli-Berg, 2009). Deshalb wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, inwieweit LSEC als nicht-professionelle Leber-APC durch Expression von Adhäsionsmolekülen und MHC-II-vermittelter Präsentation von Antigenen die Rekrutierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in die Leber beeinflussen.

Da T-Zellen vor allem unter entzündlichen Bedingungen in periphere Gewebe einwandern, wurden entzündungsinduzierte Änderungen in der Expression von Adhäsionsmolekülen und MHC-II durch LSEC sowie mögliche Konsequenzen für die Adhäsion und Transmigration von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen betrachtet. LSEC exprimierten konstitutiv ICAM-1, VCAM-1 sowie MHC-II und die Expression dieser Moleküle durch zytokinaktivierte LSEC war signifikant erhöht. Dass aktivierte LSEC Adhäsionsmoleküle verstärkt exprimierten, steht im Einklang mit Studien, welche die erhöhte Expression von ICAM-1 auf humanen Endothelzellen der *Vena umbilicalis* und *Vena saphena magna* (Dustin and Springer, 1988) sowie die Induktion von VCAM-1 auf humanen intestinalen mikrovaskuläre Endothelzellen (Haraldsen, et al., 1996) nach Zytokinstimulation *in vitro* beschreiben. Eine erhöhte Expression beider Adhäsionsmoleküle wurde darüber hinaus in der murinen Mikrovaskulatur des Herzens, Dünndarms und Gehirns nach Gabe von TNF α oder LPS *in vivo* gezeigt (Henninger, et al., 1997).

Die maßgebliche Beteiligung von Adhäsionsmolekülen an der Einwanderung von Leukozyten in entzündete und gesunde Gewebe ist in verschiedenen Tiermodellen beschrieben worden. So wurden bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* (Yoshida, et al., 1993) und einem intestinalen Ischämie/Reperfusionsmodel (Kurose, et al., 1994) die ICAM-1-abhängige Einwanderung von Leukozyten in die mesenterialen Venolen von Ratten, bei einer kutanen verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion die VCAM-1-

abhängige Migration von Lymphozyten in die Haut von Rhesusaffen (Silber, et al., 1994), bei einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis die ICAM-1- und VCAM-1-abhängige Rekrutierung von Lymphozyten in das Gehirn von Mäusen (Steffen, et al., 1994) sowie bei einem adoptiven T-Zelltransfermodell die ICAM-1- und VCAM-1-abhängige intrahepatische Akkumulation von aktivierten CD8⁺ T-Zellen (John and Crispe, 2004) gezeigt. Die Analyse des Einflusses endothelialer Adhäsionsmoleküle auf die Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel *in vitro* zeigte jedoch, dass trotz erhöhter Expression von ICAM-1 und VCAM-1 durch zytokinaktivierte LSEC die Adhäsion und Transmigration von CD4⁺ T-Zellen nicht verändert war.

Im Hinblick auf weitere Faktoren, die *in vivo* die Migration von T-Zellen beeinflussen können, wurde die Akkumulation antigenspezifischer Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen in Geweben, in denen das Antigen lokalisiert ist, beschrieben. So wurde nach einer Influenzavirusinfektion (Roman, et al., 2002) und einer subkutanen Antigeninjektion (Reinhardt, et al., 2003) die verstärkte Einwanderung von antigenspezifischen Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen in das Lungen- bzw. Hautgewebe gezeigt. Da LSEC konstitutiv MHC-II exprimieren (Knolle, et al., 1999; Lohse, et al., 1996; Rubinstein, et al., 1986), wurde untersucht, welche Auswirkungen die Präsentation des Antigens OVA durch das Lebersinusendothel auf die Rekrutierung von OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen hat. Dabei führte die Antigenpräsentation durch zytokinaktivierte LSEC-*Monolayer* zu einer verstärkten Adhäsion und transendothelialen Migration von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen. Somit wurden *in vitro* erste Hinweise auf eine antigenabhängige Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel unter entzündlichen Bedingungen erbracht. Während die Aktivierung des Endothels oder die Antigenpräsentation durch ein nicht-aktiviertes Endothel allein kaum die

genannten Prozesse beeinflussten, führte die Kombination beider zu einem überadditiven Effekt und resultierte in der präferentiellen Rekrutierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen. Die endotheliale Antigenpräsentation könnte damit den Verlauf adaptiver Immunantworten als Reaktion auf lokale Infektionen und Entzündungen in der Leber, aber auch die Entwicklung einer AIH beeinflussen.

Ob die Antigenpräsentation durch Endothelien der Gewebe, in denen die Antigene vorhanden sind, die Rekrutierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen fördert, wird kontrovers diskutiert. Humane vaskuläre Endothelien exprimieren konstitutiv MHC-II (Choi, et al., 2004; Hayry, et al., 1980; Pober, 1999), scheinen sich aber hinsichtlich der Beeinflussung der Migration antigenspezifischer T-Zellen organabhängig zu unterscheiden. Während die Antigenpräsentation IFN γ -aktivierter Endothelzellen der *Vena umbilicalis* die Transmigration antigenspezifischer *Memory* CD4⁺ T-Zellen verstärkte (Marelli-Berg, et al., 1999), hatte die Antigenpräsentation aktivierter dermalen mikrovaskulärer Endothelzellen keinen Einfluss auf die Rekrutierung antigenspezifischer Effektor/*Memory* T-Zellen (Pober, et al., 2001). Murine Endothelien exprimieren in der Regel entweder kein MHC-II oder nur nach Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine (Choo, et al., 1997; de Waal, et al., 1983; Girvin, et al., 2002; St Louis, et al., 1993). Damit scheint das Lebersinusendothel aufgrund der konstitutiven MHC-II-Expression eine Sonderstellung einzunehmen. Eine im Vergleich zum ruhenden Endothel signifikant erhöhte Expression von MHC-II sowie der kostimulatorischen Moleküle ICAM-1 und VCAM-1 durch zytokinaktivierte LSEC legte die Vermutung nahe, dass inflammatorische Bedingungen die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung durch das Lebersinusendothel fördern. Da die Stimulierung des TCR zur Aktivierung von Integrinen und dadurch zur Adhäsion von T-Zellen an ein Endothel führt (Dustin, et al., 1997; Dustin and Springer, 1989), könnten eine verstärkte

Antigenpräsentation und die Vermittlung von kostimulatorischen Signalen durch das Lebersinusendothel, aber auch eine aktivierungsabhängige Adhäsion der T-Zellen an das Endothel (Bertolino, et al., 2005) ursächlich für die antigenabhängige Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen durch aktivierte LSEC sein.

Die Leber ist ein Organ mit immunmodulatorischen Funktionen, das eher Toleranz als Immunität induziert. Eine der Aufgaben besteht in der Beseitigung aktivierter T-Zellen, die präferentiell in die Leber migrieren (Hamann, et al., 2000; Klugewitz, et al., 2002b; Mehal, et al., 1999). Sowohl eine ubiquitäre (Huang, et al., 1994; Klugewitz, et al., 2002a) als auch eine intrahepatische (Bertolino, et al., 2001; Bertolino, et al., 2005) Antigenpräsentation führen zur Akkumulation antigenspezifischer T-Zellen in der Leber. Dort kommt es durch Interaktionen mit intrahepatischen APC zur Induktion von T-Zelltoleranz (Ferber, et al., 1994; Limmer, et al., 2000; Limmer, et al., 2005) oder Apoptose und Deletion (Bertolino, et al., 1995; Huang, et al., 1994). Ob die Präsentation von Antigenen durch das Lebersinusendothel *in vivo* einen Einfluss auf die Rekrutierung antigenspezifischer Effektor CD4⁺ T-Zellen in die Leber und damit auf die genannten Prozesse hat, war nicht bekannt und wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. In *Homingassays* wurde nach dem adoptiven Transfer OVA-spezifischer, *in-vitro*-differenzierter Th1-Zellen und der einmaligen intravenösen Gabe des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids unter den Bedingungen einer ubiquitären Antigenpräsentation eine erhöhte intrahepatische Akkumulation antigenspezifischer Th1-Zellen gezeigt, während bei einer auf das Lebersinusendothel beschränkten Antigenpräsentation die Migration OVA-spezifischer Th1-Zellen nicht verändert war. Im ersten Fall stehen die Daten im Einklang mit Studien, welche die generell verstärkte Migration aktivierter T-Zellen in die Leber beschreiben (Hamann, et al., 2000; Klugewitz, et al., 2002b; Mehal, et al., 1999). Es ist anzunehmen, dass durch die ubiquitäre Antigenpräsentation, die

sowohl in den sekundären lymphatischen Organen als auch in der Leber stattfindet, eine Reaktivierung der antigenspezifischen Th1-Zellen erfolgte, die daraufhin verstärkt in der Leber akkumulierten. Dagegen scheint die Antigenpräsentation durch ein nicht-aktiviertes Lebersinusendothel keinen Einfluss auf die Rekrutierung antigenspezifischer Effektor CD4⁺ T-Zellen in die Leber zu haben. Andererseits wurde in Pilotversuchen, in denen das Antigen nicht intravenös gegeben sondern intrahepatisch exprimiert wurde, bei auf das Lebersinusendothel beschränkter Antigenpräsentation eine erhöhte Akkumulation antigenspezifischer Th1-Zellen in der Leber gezeigt – ein Hinweis darauf, dass die Art der Antigengabe über die Effizienz endothelialer Antigenpräsentation in der Leber entscheiden kann. LSEC als nicht-professionelle APC exprimieren unter homöostatischen Bedingungen wenig MHC-II sowie kostimulatorische Moleküle und präsentieren daher vermutlich Antigene mit geringerer Effizienz als professionelle MHC-II^{high} APC. Eine einmalige Gabe des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids reichte für eine Reaktivierung von antigenspezifischen Th1-Zellen bei ubiquitärer, aber möglicherweise nicht bei auf das Lebersinusendothel beschränkter Antigenpräsentation aus. In den TF-OVA-Mäusen dagegen wird das Antigen als membranständiges Protein konstitutiv von den Hepatozyten exprimiert (Derkow, et al., 2007) und ist durch Prozesse wie das Protein-*Shedding* oder auch durch Apoptose von OVA-exprimierenden Hepatozyten permanent im Lebergewebe vorhanden. Dadurch könnte OVA durch LSEC kontinuierlich aufgenommen und präsentiert werden.

Insgesamt kann die Frage, ob eine Antigenpräsentation durch das Lebersinusendothel einen Einfluss auf die Migration antigenerfahrener Effektor/*Memory* T-Zellen in die Leber hat, nicht abschließend beurteilt werden. Erste Daten deuten auf eine Funktion des Lebersinusendothels bei der Rekrutierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in der Leber hin.

5.2 Einfluss des Lebersinusendothels auf die Induktion eines Darm-*Homing*phänotyps bei CD4⁺ T-Zellen

Der Ort der Antigenpräsentation und das *microenvironment*, die Art der APC sowie der Grad der Aktivierung bestimmen den funktionellen Phänotyp von T-Zellen und deren lokale Wirkung. Das klassische Konzept des *Homing* besagt, dass antigenerfahrene Effektor/*Memory* T-Zellen präferentiell in die Gewebe migrieren, die mit den sekundären lymphatischen Organen assoziiert sind, in denen die T-Zellen initial nach Kontakt mit einem Antigen aktiviert wurden (Agace, 2006; Cahill, et al., 1977; Campbell and Butcher, 2002). Passend zu diesem Konzept wurde in *Homing*assays die Migration von durch LSEC antigenabhängig aktivierte CD4⁺ T-Zellen in die Leber gezeigt. Ob die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung durch LSEC jedoch einen Leber-*Homing*phänotyp bei CD4⁺ T-Zellen induzierte, oder ob es sich dabei um die generell verstärkte Migration aktivierter T-Zellen in die Leber handelte, bleibt aufgrund bisher nicht identifizierter spezifischer *Homing*rezeptoren für die Migration in die Leber unter homöostatischen Bedingungen unklar. Ein für die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber notwendiger *Homing*rezeptor könnte der unbekannte Ligand des VAP-1 sein, ein Adhäsionsmolekül, das von humanen LSEC konstitutiv exprimiert wird und die Adhäsion und Transmigration von Lymphozyten durch humanes Lebersinusendothel fördert (Lalor, et al., 2002; McNab, et al., 1996).

Abweichend vom klassischen *Homing*konzept induzierten LSEC als eine Population von nicht-professionellen APC der Leber einen Darm-*Homing*phänotyp bei CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zur Leber wurden für die Migration in den Darm notwendige *Homing*rezeptoren, $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9, identifiziert (Hamann, et al., 1994; Svensson, et al., 2002). LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen exprimierten diese darmspezifischen *Homing*rezeptoren und migrierten in das Darmgewebe sowie das

GALT. Damit zeigten T_{LSEC} einen mit T-Zellen, die durch GALT-DC aktiviert wurden, vergleichbaren Phänotyp (Iwata, et al., 2004; Johansson-Lindbom, et al., 2005; Mora, et al., 2005), wobei im letzteren Fall das klassische Konzept des *Homings* zum Tragen kommt – APC aus dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe induzierten einen Darm-*Homing*phänotyp.

Iwata *et al.* beschrieben die physiologische Relevanz von Vitamin A für die Migration von T-Zellen in das Darmgewebe und legten die Notwendigkeit des Vitamin A-Metaboliten Retinolsäure für die Induktion darmspezifischer *Homing*rezeptoren auf aktivierten T-Zellen dar (Iwata, et al., 2004). Übereinstimmend mit diesen Daten erfolgte die Induktion des Darm-*Homing*phänotyps durch LSEC in Abhängigkeit von Vitamin A und Retinolsäure. Die Blockade des Retinolsäurerezeptors durch dessen Antagonisten LE 540 während der antigenabhängigen Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen durch LSEC resultierte nicht nur in einer signifikant reduzierten Expression der darmspezifischen *Homing*rezeptoren und einer daraus folgenden sehr geringen Migration der T_{LSEC} in das Darmgewebe und die PP, sondern führte auch zu einer stark erhöhten Expression von P-Lig, ein für die Migration in die Haut und entzündete Gewebe notwendiger *Homing*rezeptor (Astrup, et al., 1997; Campbell and Butcher, 2002; Tietz, et al., 1998). Durch das Fehlen des *Signaling* des Retinolsäurerezeptors bei der antigenabhängigen Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC wurde ein *Homing*phänotyp induziert, der vergleichbar war mit dem von CD4⁺ T-Zellen, die durch professionelle APC der Milz aktiviert worden waren. Diese Ergebnisse verdeutlichen einerseits die Notwendigkeit von Retinolsäure für die Induktion des Darm-*Homing*phänotyps bei LSEC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Andererseits zeigen sie, dass die Abwesenheit von Retinolsäure die Induktion eines neuen *Homing*phänotyps durch

LSEC verursacht. Retinolsäure ist somit von großer Bedeutung für die Regulation der gewebespezifischen Migration von T-Zellen.

Die Expression gewebespezifischer *Homing*rezeptoren auf Effektor/*Memory* T-Zellen kann reversibel sein und durch Reaktivierung der T-Zellen in Geweben, die verschieden zum Gewebe der initialen Aktivierung sind, verändert werden. Diese Flexibilität ist für Immunantworten bei sich ausbreitenden Infektionen sowie metastasierenden Tumoren wichtig. Bezüglich der reversiblen Expression von *Homing*rezeptoren wurde eine Anpassung des durch GALT-DC oder pLN-DC induzierten *Homing*phänotyps beschrieben, wenn die aktivierten CD8⁺ T-Zellen durch DC aus dem jeweils anderen lymphatischen Organ restimuliert wurden (Dudda, et al., 2005; Mora, et al., 2005). Auch die Expression des *cutaneous lymphocyte antigen* auf humanen CD4⁺ T-Zellen, einem Liganden des E-Selektins, wurde nach einer Reaktivierung unter Th1- oder Th2-Bedingungen reversibel herauf- bzw. herunterreguliert (Teraki and Picker, 1997). Da LSEC-aktivierte CD4⁺ T-Zellen den *Homing*rezeptor CD62L exprimierten und in die sekundären lymphatischen Organe migrierten, war von Interesse, ob der *Homing*phänotyp von T_{LSEC} nach deren Reaktivierung in einem anderen Gewebe als der Leber moduliert wird. Nach Restimulierung von durch LSEC initial aktivierten CD4⁺ T-Zellen durch professionelle Milz-APC war die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin unverändert hoch, während die reaktivierten CD4⁺ T-Zellen kein CCR9, jedoch verstärkt P-Lig exprimierten. Aufgrund der stabilen Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin können diese Zellen somit weiterhin in das Darmgewebe migrieren. Gleichzeitig kann die Reinduktion von P-Lig eine verstärkte Migration in die Haut und entzündete Gewebe ermöglichen, was den Wirkungsbereich der T_{LSEC} erweitern würde. Die gezeigte differentielle Plastizität der Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren stimmt mit Studien überein, welche die Stabilität

der in Anwesenheit von Retinolsäure induzierten $\alpha_4\beta_7$ -Integrin- und CCR9-Expression von durch Leber-DC aktivierten $CD8^+$ T-Zellen (Eksteen, et al., 2009) oder durch Milz-DC stimulierte B-Zellen (Mora, et al., 2006) untersuchten. Die nach Restimulierung durch professionelle APC der Milz erhöhte P-Lig-Expression kann mit der ebenfalls erhöhten Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen zusammenhängen. P-Lig ist nicht nur als hautspezifischer *Homing*rezeptor, sondern auch als ein Molekül beschrieben, das von aktivierten $CD4^+$ T-Zellen exprimiert wird. So wurde auf Th1-Zellen, $IFN\gamma$ - und IL-12-stimulierten Th2-Zellen (Lim, et al., 1999) sowie chronisch antigenaktivierten $CD4^+$ T-Zellen (Damle, et al., 1992) eine hohe P-Lig-Expression nachgewiesen.

Bezüglich der Stabilität eines initial induzierten *Homing*phänotyps stellte sich weiterführend die Frage, ob präferentiell in die Leber migrierende, antigenerfahrene Effektor/*Memory* T-Zellen durch das Lebersinusendothel in ihren *Homing*eigenschaften moduliert werden können. Dahingehend wurde gezeigt, dass die Reaktivierung antigenspezifischer Th1-Zellen durch LSEC die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf den Effektor $CD4^+$ T-Zellen und deren verstärkte Migration in das Darmgewebe und das GALT induzierte. Diese Modulation des *Homing*phänotyps antigenerfahrener Th1-Zellen durch das Lebersinusendothel könnte Bedeutung für die Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen haben.

Die für GALT-DC beschriebene Fähigkeit zur Induktion des Darm-*Homing*phänotyps ist auf die spezifische Expression von RALDH zurückzuführen (Iwata, et al., 2004), die essentiell für den letzten Schritt der Umsetzung von Retinol, dessen Vorläufer das mit der Nahrung aufgenommene Vitamin A ist, zu Retinolsäure sind (Duester, 2000). In dieser Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob LSEC die enzymatische Ausstattung zur Umwandlung von Vitamin A zu Retinolsäure und dadurch zur Induktion des Darm-*Homing*phänotyps bei $CD4^+$ T-Zellen besitzen. LSEC exprimierten die

mRNA von RALDH1 und RALDH4. Da RALDH4 nicht die für die Induktion von darmspezifischen *Homing*rezeptoren notwendige Oxidation von *all-trans*-Retinal zu *all-trans*-Retinolsäure, sondern die von *9-cis*-Retinal zu *9-cis*-Retinolsäure katalysiert (Sima, et al., 2009) und bis heute weder geklärt worden ist, ob *9-cis*-Retinolsäure *in vivo* entsteht, noch welche Funktion es hat (Wolf, 2006), wurde eine Relevanz der enzymatischen Aktivität von RALDH1 in LSEC für die Induktion des Darm-*Homing*phänotyps bei CD4⁺ T-Zellen angenommen. Dass das von LSEC exprimierte RALDH1 funktionell ist, zeigte vor allem die Vitamin A-abhängige Induktion der Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf CD4⁺ T-Zellen durch LSEC aus Vitamin A-defizienten Mäusen. Nur nach Zugabe von Retinol zu den *in-vitro*-Kokulturen induzierten LSEC aus Vitamin A-defizienten Mäusen die Expression des darmspezifischen *Homing*rezeptor auf CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu erfolgte keine Induktion von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf CD4⁺ T-Zellen, die APC-unabhängig durch anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper aktiviert wurden. Somit können LSEC in vergleichbarer Weise wie GALT-DC Vitamin A in die für die Induktion von darmspezifischen *Homing*rezeptoren notwendige *all-trans*-Retinolsäure umsetzen.

Die Leber ist das größte Speicherorgan für Vitamin A. Vitamin A wird in den Ito-Zellen in unmittelbarer Nähe zum Lebersinusendothel gespeichert und von dort aus in den Disse'schen Raum abgegeben (Blomhoff and Wake, 1991; Friedman, 1996), womit eine konstante Versorgung der LSEC mit Vitamin A sichergestellt ist. Neben den LSEC gibt es weitere leberresidente APC-Populationen, deren Fähigkeit zur Induktion eines Darm-*Homing*phänotyps bei CD8⁺ T-Zellen von Eksteen *et al.* näher untersucht wurden. Sowohl Ito-Zellen als nicht-professionelle APC als auch Leber-DC als professionelle APC induzierten nur eine niedrige Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren, woraus geschlossen wurde, dass diese APC-Populationen nicht

die Migration von in der Leber aktivierten $CD8^+$ T-Zellen in den Darm fördern (Eksteen, et al., 2009). Darüber hinaus induzierten LSEC-depletierte $MHC-II^{high}$ Leber-APC nur wenig $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und kein CCR9 auf $CD4^+$ T-Zellen (Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit wurde somit erstmalig gezeigt, dass LSEC als nicht-professionelle APC der Leber die Expression von darmspezifischen *Homing*rezeptoren und die Migration von in der Leber aktivierten oder reaktivierten $CD4^+$ T-Zellen in den Darm induzieren.

Diese vom klassischen Konzept des *Homing* abweichenden Daten lassen sich in das von Grant *et al.* postulierte Modell der enterohepatischen Lymphozytenzirkulation integrieren. Das Modell nimmt die Migration von durch APC aus dem Darm aktivierte T-Zellen in die Leber und umgekehrt an (Grant, et al., 2002). Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen entwickeln häufig extraintestinale Erkrankungen und das Modell der enterohepatischen Lymphozytenzirkulation erklärt dabei eine mögliche klinische Koinzidenz der Pathogenese in Darm und Leber. Bisher wurde eine Richtung des Kreislaufs beschrieben, und zwar die unter entzündlichen Bedingungen im Darm erfolgende Migration von durch GALT-DC aktivierte Effektor/*Memory* T-Zellen in die Leber (Eksteen, et al., 2004; Grant, et al., 2001). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten geben erste Hinweise auf eine Migration von in der Leber initial aktivierten oder reaktivierten $CD4^+$ T-Zellen in den Darm, die den postulierten Kreislauf schließen könnten (Abb. 29).

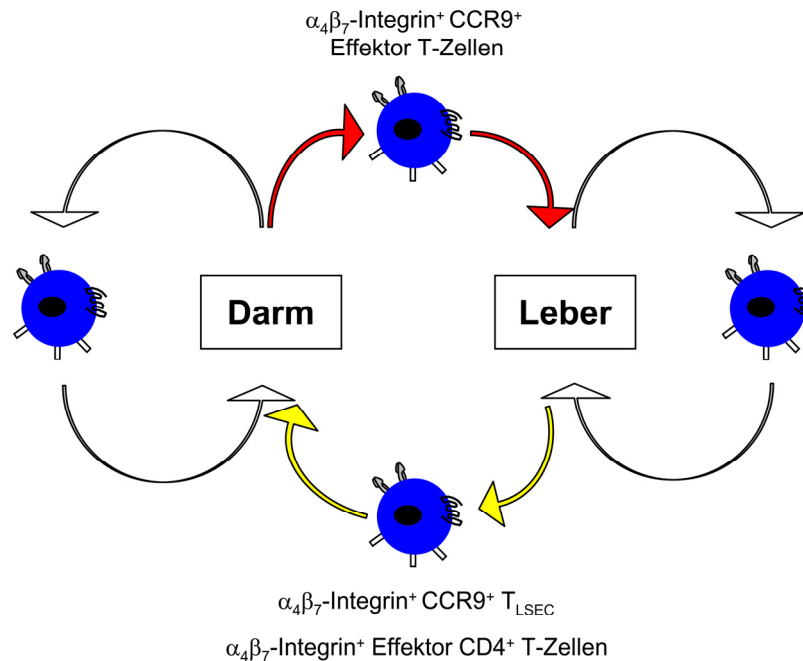


Abb. 29. Modell des enterohepatischen Kreislaufs. Das Modell des enterohepatischen Kreislaufs postuliert die Migration von aktivierten T-Zellen aus dem Darm in die Leber sowie aus der Leber in den Darm. Durch GALT-DC aktivierte T-Zellen können nicht nur in das Darmgewebe, sondern aufgrund der ektopischen Expression von MAdCAM-1 und CCL25 auch in das Lebergewebe migrieren. LSEC induzieren einen Darm-Homingphänotyp, so dass in der Leber aktivierte CD4⁺ T-Zellen oder restimulierte Th1-Zellen in der Lage sind, in das Darmgewebe zu migrieren.

Während aufgrund der ektopischen Expression von MAdCAM-1 und CCL25 $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ und CCR9⁺ Effektor T-Zellen aus dem entzündeten Darm in das Lebergewebe einwandern und damit extraintestinale Manifestationen von entzündlichen Darmerkrankungen, wie die primär sklerosierende Cholangitis, erklärt werden (Adams and Eksteen, 2006; Eksteen, et al., 2004; Grant, et al., 2001), könnte aufgrund der regulatorischen Funktion LSEC-aktivierter CD4⁺ T-Zellen (Kruse, et al., 2009) die Migration von in der Leber induzierten regulatorischen T-Zellen in den Darm die lokale Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen fördern oder intestinale Entzündungen kontrollieren. Die induzierte Migration von in der Leber reaktivierten Effektor CD4⁺ T-Zellen in den Darm könnte dagegen dort eine Pathogenese induzieren oder bei bestehender Darmerkrankung diese verstärken.

5.3 Einfluss des Lebersinusendothels auf die chemokinabhängige Migration von CD4⁺ T-Zellen in das Lebergewebe

Von zentraler Bedeutung für die Extravasation von T-Zellen sind Chemokine und deren Bereitstellung und Immobilisierung durch vaskuläre Endothelien unter Blutflussbedingungen. Die Bindung von Chemokinen an durch naive oder aktivierte T-Zellen exprimierte, spezifische Chemokinrezeptoren führt zur festen Adhäsion der T-Zellen an das Endothel und ermöglicht deren kontrollierte Einwanderung in das angrenzende Gewebe (Campbell, et al., 1998; Chan, et al., 2001; Constantin, et al., 2000). In diesem Zusammenhang wurde die erhöhte Transmigration von CD4⁺ T-Zellen nach basolateraler Vorinkubation von LSEC-*Monolayer* mit homöostatischen oder inflammatorischen Chemokinen gezeigt (Schrage, et al., 2008b). Es stellte sich die Frage, ob das Lebersinusendothel aktiv Chemokine zur Verfügung stellen und damit Einfluss auf die gewebespezifische Migration von CD4⁺ T-Zellen nehmen kann. Homöostatische Chemokine werden konstitutiv exprimiert, da sie die kontinuierliche Rezirkulation von Lymphozyten und die Immunüberwachung peripherer Gewebe koordinieren sowie an der Navigierung von Leukozytenvorläufern im Knochenmark und Thymus sowie B- und T-Zellen in spezialisierten Bereichen der sekundären lymphatischen Organe beteiligt sind. Die Expression inflammatorischer Chemokine erfolgt dagegen zeitlich begrenzt als Antwort auf Infektionen, Entzündungen und Gewebeschädigungen (Allen, et al., 2007; Mantovani, 1999; Moser and Willmann, 2004). In den betroffenen Geweben sind viele Zellpopulationen an der Expression inflammatorischer Chemokine beteiligt. In der Leber können das die LSEC sein (Leifeld, et al., 2003; Shields, et al., 1999), aber auch perivaskuläre Zellen wie Hepatozyten (Harvey, et al., 2003; Heydtmann, et al., 2005), Gallengangsepithelzellen (Kollet, et al., 2003; Marra, et al., 1998) und Ito-Zellen (Maher, et al., 1998; Schwabe,

et al., 2003). Für eine luminale endotheliale Bereitstellung perivaskulärer Chemokine sind verschiedene Wege des Chemokintransports vorstellbar: der transzelluläre Transport, die parazelluläre Diffusion durch Zwischenräume oder *tight junctions* benachbarter Endothelzellen oder die Bewegung in der Ebene der Zellmembran durch Assoziation mit Glykoproteinen (Furie and Randolph, 1995; Middleton, et al., 2002; Song and Pachter, 2004). Diesbezüglich war von Interesse, ob das Lebersinusendothel eine Transzytose von Chemokinen von der basolateralen zur apikalen Seite unterstützt und dort im Sinne einer temporären lokalen Anreicherung zur Verfügung stellt.

Eine Voraussetzung für die Transzytose ist die basolaterale Internalisierung von Chemokinen in LSEC. Dies wurde für das Chemokin CXCL12 gezeigt. Die Aufnahme von Chemokinen in LSEC war bei 4°C inhibiert. Da in diesem Temperaturbereich keine energieverbrauchenden Prozesse in der Zelle mehr ablaufen, weisen die Daten auf eine aktive, energieabhängige Internalisierung von Chemokinen in LSEC hin.

Die molekularen Mechanismen der endothelialen Chemokinaufnahme und Transzytose sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Bei kultivierten humanen Endothelzellen der *Vena umbilicalis* wurde die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR1, CXCR2 und CXCR4 beschrieben (Murdoch, et al., 1999), doch die Funktion endothelialer Chemokinrezeptoren ist weitgehend unbekannt. Es wurde jedoch die CCR2-abhängige Internalisierung von CCL2 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen des Hirns gezeigt (Dzenko, et al., 2001). Passend dazu führte die Blockierung des Chemokinrezeptors CXCR4 durch den spezifischen Antagonisten AMD 3100 zur Inhibition der basolateralen Aufnahme des Liganden CXCL12 in LSEC. Die Daten belegen die CXCR4-abhängige Aufnahme von CXCL12 in LSEC und unterstützen die These, dass endotheliale Chemokinrezeptoren bei der Initiierung der Transzytose eine Rolle spielen. Die Ergebnisse bezüglich des Einflusses des Chemokinrezeptors

CXCR3 auf die Internalisierung seines Liganden CXCL10 in LSEC stehen im Gegensatz zu denen aus dem CXCR4/CXCL12-System. CXCL10 wurde gleich stark in WT-LSEC und LSEC aus CXCR3^{-/-}-Mäusen aufgenommen. Außerdem zeigten weiterführende Versuche eine sehr niedrige mRNA-Expression von CXCR3 in nicht-aktivierten WT-LSEC (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass entweder andere, bisher nicht identifizierte Chemokinrezeptoren oder weitere Mechanismen an der Aufnahme der Liganden von CXCR3 in LSEC beteiligt sind. Vorstellbar wäre eine durch Interzeptoren vermittelte Internalisierung und Transzytose dieser inflammatorischen Chemokine in LSEC (Hadley, et al., 1994; Pruenster, et al., 2009; Rot, 2003) und die Beteiligung von GAG an den Prozessen (Wang, et al., 2005).

Die ligandeninduzierte Internalisierung von Chemokinrezeptoren kann durch Clathrin-vermittelte Endozytose erfolgen. So wurde die Clathrin-abhängige, CCL5- oder CXCL1-induzierte Internalisierung von CCR5 bzw. CXCR2 in CCR5-transfizierten CHO-Zellen (Signoret, et al., 2005) oder CXCR2-transfizierten HEK293-Zellen (Yang, et al., 1999) beschrieben. Außerdem wurde die Clathrin-abhängige Transzytose von CXCL12 in Endothelzellen des Knochenmarks gezeigt (Dar, et al., 2005). Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss der Clathrin-*Pathway* auf die Aufnahme und Transzytose von Chemokinen in LSEC hat. Die Vorbehandlung der LSEC mit CPZ, einer Substanz, welche die Bildung der Clathrin-coated Vesikel und damit den Clathrin-*Pathway* inhibiert (Wang, et al., 1993), reduzierte signifikant die Internalisierung von CXCL12 und CXCL10 in LSEC. Die Aufnahme von CXCL10 wurde nicht nur in LSEC aus WT-Mäusen, sondern auch in CXCR3^{-/-}-LSEC durch CPZ inhibiert, darauf hindeutend, dass andere Chemokinrezeptoren als der CXCR3 für die Aufnahme von CXCL10 in LSEC von Bedeutung sind. Mit Hilfe von

Transmigrationsassays wurden erste indirekte Hinweise auf eine Clathrin-abhängige Transzytose von Chemokinen durch LSEC erbracht. Da bei Transmigrationsassays in Anwesenheit von Chemokinen in der unteren Transwell®-Kammer nicht ausgeschlossen werden kann, dass Chemokine durch vom Endothel nicht bedeckte Membranporen diffundieren und direkt auf T-Zellen wirken, wurde durch basolaterale Vorinkubation der LSEC-Monolayer mit den Chemokinen sichergestellt, dass nur auf dem Endothel immobilisierte Chemokine an der Transmigration der CD4⁺ T-Zellen beteiligt sind. Die nach Inkubation der LSEC-Monolayer mit homöostatischen oder inflammatorischen Chemokinen signifikant erhöhte Transmigration von apikal auf dem Endothel liegenden CD4⁺ T-Zellpopulationen war nach basolateraler Vorbehandlung der LSEC-Monolayer mit CPZ stark vermindert. Die Daten weisen darauf hin, dass Chemokine, die sich auf der basolateralen Seite von LSEC befinden, von diesen unter Beteiligung von Clathrin-coated Vesikel apikal zur Verfügung gestellt werden, wodurch die chemokinabhängige Transmigration von CD4⁺ T-Zellen gesteigert wird. Dass zu dieser endothelialen Chemokinbereitstellung die von der basolateralen zur apikalen Seite erfolgende Transzytose von Chemokinen erforderlich ist, verdeutlichte die nach apikaler Vorinkubation der LSEC-Monolayer mit Chemokinen nicht veränderte Transmigration von CD4⁺ T-Zellen (Schrage, et al., 2008b). Diese Ergebnisse fügen sich in eine Reihe von Studien ein, welche die Transzytose des homöostatischen Chemokins CCL19 in HEV (Baekkevold, et al., 2001) sowie der inflammatorischen Chemokine CXCL8 (Middleton, et al., 1997) und CXCL10 (Mordelet, et al., 2007) im Hautendothel, CCL2 in *brain microvascular endothelial cells* (Ge, et al., 2008) und CXCL10 in Endothelzellen der Lunge (Mordelet, et al., 2007) beschreiben. Middleton et al. zeigten die Caveolae-vermittelte Transzytose von CXCL8 im Hautendothel (Middleton, et al., 1997). Da LSEC das Hüllprotein Caveolin-1 exprimierten, war

ebenfalls eine Beteiligung von Caveolae an der Transzytose von Chemokinen in LSEC denkbar. Es war jedoch weder die Aufnahme von Chemokinen in LSEC nach deren Vorinkubation mit den Caveolae-Inhibitoren Filipin oder Nystatin beeinträchtigt, noch wurde eine Kolo-kalisation von Caveolin-1 und CXCL12 gezeigt. Deshalb wurde eine Beteiligung von Caveolae an der Transzytose dieser Chemokine in LSEC ausgeschlossen. Es könnte somit von der Art des Endothels und Chemokins sowie vom Mechanismus der Chemokinaufnahme abhängen, welche Vesikel an der endothelialen Transzytose von Chemokinen beteiligt sind.

Die endotheliale Immobilisierung von Chemokinen ist eine Voraussetzung für deren lokale Anreicherung und damit Erhöhung ihrer Wirksamkeit unter Blutflussbedingungen (Hoogewerf, et al., 1997; Middleton, et al., 1997; Patel, et al., 2001). So wurde für die inflammatorischen Chemokine CCL2, CCL4 oder CCL5 gezeigt, dass diese an Heparansulfat binden und in gebundener Form die integrinabhängige Adhäsion von T-Zellen an Endothelzellen der Cornea des Rindes (Gilat, et al., 1994), humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (Ali, et al., 2001) oder Endothelzellen des synovialen Gewebes von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Tanaka, et al., 1998) induzieren und im Vergleich zur löslichen Form verstärken. Da Heparan- und Chondroitinsulfat die am stärksten exprimierten GAG in der Leber sind (Gressner, et al., 1977), wurde untersucht, ob diese beiden GAG an der Chemokinbereitstellung durch LSEC beteiligt sind. Die Behandlung mit Heparinase I oder Chondroitinase führt zu einer Reduktion von auf der Zelloberfläche vorhandenem Heparan- bzw. Chondroitinsulfat und verringert damit die Zahl potentieller Bindungsstellen für Chemokine (Hoogewerf, et al., 1997; Tanaka, et al., 1998). Nach apikaler Vorbehandlung der LSEC-Monolayer mit Heparinase I oder Chondroitinase war die CXCL12- und CXCL9-abhängige CD4⁺ T-Zell-Transmigration signifikant verringert. Die

Daten legen den Schluss nahe, dass im Vergleich zu unbehandelten LSEC weniger Chemokin zur Verfügung stand und dass LSEC sowohl Heparansulfat als auch Chondroitinsulfat zur Immobilisierung von homöostatischen und inflammatorischen Chemokinen nutzen.

Zusammenfassend unterstützen die in dieser Arbeit gezeigte basolaterale Aufnahme und apikale Bereitstellung von homöostatischen und inflammatorischen Chemokinen durch das Lebersinusendothel und die daraus resultierende chemokinabhängige Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen den angenommenen Mechanismus eines transzellulären endothelialen Transports von Chemokinen und bieten eine Erklärung, wie perivaskulär produzierte Chemokine die Extravasation von T-Zellen in das Lebergewebe induzieren können (Abb. 30).

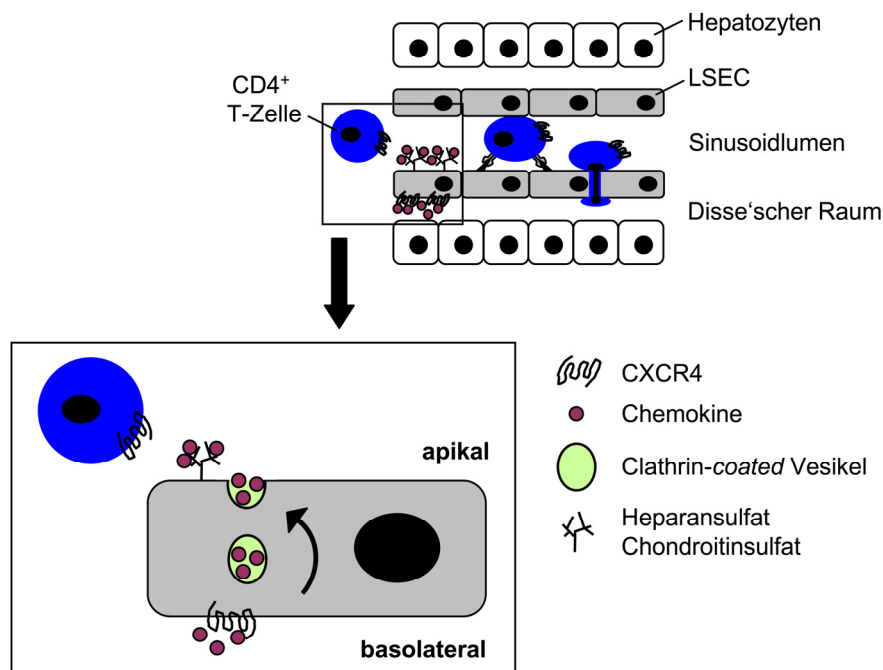


Abb. 30. Modell der Bereitstellung perivaskulärer Chemokine durch LSEC. Perivaskuläre Chemokine werden basolateral von LSEC aufgenommen und apikal im Lumen der Sinusoide zirkulierenden T-Zellen zur Verfügung gestellt. CXCR4, Clathrin-coated Vesikel sowie Heparan- und Chondroitinsulfat sind an den Prozessen der Chemokinaufnahme, Transzytose und Immobilisierung durch das Lebersinusendothel beteiligt.

Die Daten verdeutlichen die Bedeutung des Lebersinusendothels für die Immunüberwachung der Leber und die Rekrutierung von Immunzellen unter entzündlichen Bedingungen. Die *in vitro* nach Inhibition des Clathrin-*Pathway* in LSEC gezeigte Reduktion der chemokinabhängigen Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel führte zu der Frage, ob *in vivo* durch Gabe des Clathrin-Inhibitors CPZ ähnliche Effekte denkbar wären, die womöglich von therapeutischen Nutzen bei Entzündungen der Leber sind.

Unter Verwendung des Modells der Con A-induzierten T-Zell-vermittelten Hepatitis wurde gezeigt, dass die hepatische Expression der inflammatorischen Chemokine CXCL9 und CXCL10 während einer AIH stark ansteigt. CXCL9 wurde darüber hinaus in LSEC nachgewiesen. Diese können, wie gezeigt, inflammatorische Chemokine internalisieren oder unter entzündlichen Bedingungen selbst exprimieren (Leifeld, et al., 2003; Shields, et al., 1999). Aufgrund der erhöhten hepatischen Expression inflammatorischer Chemokine während der Con A-induzierten AIH war es vorstellbar, dass die chemokinabhängige Rekrutierung von aktivierten T-Zellen in die Leber für die Pathogenese von Bedeutung ist. Diesbezüglich wurde die Akkumulation aktivierter CXCR3⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Leber während der Con A-induzierten AIH gezeigt. Die Gabe des Clathrin-Inhibitors CPZ resultierte in einem stark abgeschwächten Verlauf der AIH und einem signifikant niedrigeren Anteil aktivierter CXCR3⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Leber. Da ausgeschlossen wurde, dass der Clathrin-Inhibitor einen Einfluss auf die Con A-induzierte T-Zellaktivierung oder die Expression von inflammatorischen Zytokinen (Ikeda, et al., 1997) *in vivo* hatte, geben die Daten erste Hinweise darauf, dass die verminderte chemokinabhängige Migration von aktivierten CD4⁺ T-Zellen in das Lebergewebe ein Grund für die Suppression der Autoimmunhepatitis ist.

Die Annahme, dass der Clathrin-Inhibitor die chemokinabhängige Rekrutierung von T-Zellen in die Leber unter entzündlichen Bedingungen beeinflusst, wurde durch die Analyse der Migration transferierter CD4⁺ T-Zellen in gesunde Lebern oder Lebern mit etablierter AIH untermauert. Die Migration von CD4⁺ T-Zellen unter entzündlichen Bedingungen in das Lebergewebe war nach Gabe des Clathrin-Inhibitors signifikant verringert, während unter homöostatischen Bedingungen kaum ein Einfluss auf die Rekrutierung der Zellen beobachtet wurde. Diese Resultate im Zusammenhang mit der hohen intrahepatischen Expression inflammatorischer Chemokine während der AIH unterstützen die Annahme eines inhibitorischen Effekts von CPZ auf die entzündungsinduzierte Chemokinbereitstellung durch das Lebersinusendothel.

Inhibitoren von Chemokinen oder Chemokinrezeptoren haben sich als potentielle anti-inflammatorische Wirkstoffe herausgestellt (Glass, et al., 2004; Hancock, et al., 2000; Johnson, et al., 2005; Veazey, et al., 2005; Zheng, et al., 2005). Ein Problem bei der Beeinflussung des Chemokin/Chemokinrezeptorsystems liegt in dessen Redundanz, da ein Chemokin der Ligand von verschiedenen Chemokinrezeptoren sein kann und ein Chemokinrezeptor möglicherweise unterschiedliche Chemokine bindet. Das könnte zu einer verminderten Spezifität und unerwünschten Nebeneffekten, wie der Beeinflussung von T-Zellfunktionen oder anderer wichtiger Prozesse, z.B. der Angiogenese, führen. In der vorliegenden Arbeit wurden im Hinblick auf die Bedeutung des Lebersinusendothels für die chemokinabhängige Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in das Lebergewebe erste Hinweise darauf erbracht, dass, als ein neuer, die genannten Nebeneffekte möglicherweise ausschließender Ansatz, Interventionen in die endotheliale Chemokinbereitstellung während einer Entzündung anti-inflammatorisch wirken. Da in der Leber im Gegensatz zu anderen Organen die Migration von T-Zellen in das Parenchym durch Chemokine initiiert wird (Wong, et al., 1997), ist dieses Organ

für erste Studien bezüglich der entzündungsinduzierten endothelialen Chemokinbereitstellung als potentiell Target sehr gut geeignet.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Präsentation von Antigenen durch aktivierte LSEC führte zu einer verstärkten Adhäsion und Transmigration antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen durch das Lebersinusendothel. Die antigenspezifische Aktivierung naiver $CD4^+$ T-Zellen oder Restimulierung von Th1-Zellen durch LSEC induzierte die Expression darmspezifischer *Homing*rezeptoren und führte zur Migration von in der Leber aktivierten $CD4^+$ T-Zellen in den Darm und das GALT. Als Folge der aktiven Bereitstellung von homöostatischen und inflammatorischen Chemokinen förderten LSEC die chemokinabhängige Transmigration von $CD4^+$ T-Zellen durch das Lebersinusendothel. Die Gabe eines Inhibitors der endothelialen Chemokinaufnahme und Transzytose *in vitro* suppressierte den Verlauf einer AIH und resultierte in einer verminderten chemokinabhängigen Rekrutierung aktivierter $CD4^+$ T-Zellen in das Lebergewebe. Zusammenfassend unterstreichen die Daten der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Lebersinusendothels für die Regulation und Modulation der gewebespezifischen Migration von $CD4^+$ T-Zellen. Die damit gezeigte neue funktionelle Ebene der Leber als immunologisches Organ könnte Relevanz für die Immunüberwachung, den Verlauf adaptiver Immunantworten in der Leber und die Entwicklung einer AIH, aber auch für eine Pathogenese im Darm oder die Induktion oraler Toleranz haben.

Die *in-vitro*-Daten bezüglich des Einflusses der endothelialen Präsentation von Antigenen auf die Rekrutierung antigenspezifischer $CD4^+$ T-Zellen zusammen mit einigen Studien (Marelli-Berg, et al., 2004; Savinov, et al., 2003) weisen auf eine Bedeutung der Antigenpräsentation durch das Lebersinusendothel für die

antigenspezifische Migration und Akkumulation von Effektor/*Memory* T-Zellen unter entzündlichen Bedingungen in die Leber hin. Weiterführende Experimente sollten sich daher auf die Rekrutierung antigenspezifischer Effektor/*Memory* CD4⁺ T-Zellen durch das Lebersinusendothel während einer Hepatitis konzentrieren. Dazu ist ebenfalls eine Optimierung der Antigengabe in den verwendeten Modellen notwendig. Neben der endogenen Expression von OVA im Lebergewebe von TF-OVA-Mäusen wären eine kontinuierliche orale Gabe des Antigens als Protein oder spezifische Modifikationen des Peptids denkbar, um eine verlängerte Halbwertszeit *in vivo* und Akkumulation des Antigens in der Leber und damit eine effizientere Präsentation durch das Lebersinusendothel zu erreichen.

In vivo ist vor allem die Migration aktivierter Effektor/*Memory* T-Zellen in die Leber relevant. Da naive T-Zellen jedoch auch in geringen Mengen durch die Leber zirkulieren und durch vom Lebersinusendothel präsentierte Antigene aktiviert werden (Bertolino, et al., 2001; Knolle, et al., 1999; Kruse, et al., 2009; Limmer, et al., 2000), wäre es ebenfalls interessant zu untersuchen, ob die endotheliale Antigenpräsentation einen Einfluss auf die Einwanderung naiver CD4⁺ T-Zellen in das Lebergewebe hat.

Bisherige Analysen zur Induktion eines Darm-*Homing*phänotyps durch LSEC wurden mit *in vitro* generierten T_{LSEC} durchgeführt. Der Nachweis der Induktion eines Darm-*Homing*phänotyps *in vivo* würde die Relevanz der Daten für das Modell des enterohepatischen Kreislaufs hervorheben. Ob dabei die Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch LSEC für die Induktion des Darm-*Homing*phänotyps notwendig ist, oder ob eine Aktivierung durch andere APC der Leber bei gleichzeitiger Bereitstellung von Retinolsäure durch LSEC ebenfalls zur Migration von T-Zellen in den Darm führt, ist nicht bekannt und wird unter Verwendung von LSEC aus MHC-II^{-/-}-Mäusen weiterführend untersucht. Diesbezüglich wurde eine essentielle Rolle von durch

Stromazellen aus den mLN metabolisierter Retinolsäure bei der Induktion des Darm-*Homing*phänotyps durch GALT-DC beschrieben (Hammerschmidt, et al., 2008).

Ob durch LSEC aktivierte CD4⁺ T-Zellen aufgrund ihrer regulatorischen Funktion und der Fähigkeit in den Darm zu migrieren den Verlauf entzündlicher Darmerkrankungen beeinflussen, wird unter Verwendung eines Mausmodells einer chronischen Colitis in weiteren Versuchen untersucht.

Weiterführende Versuche haben die von Retinolsäure abhängige Induktion darmspezifischer *Homing*rezeptoren auf naiven CD8⁺ T-Zellen durch LSEC gezeigt (Christine Rudolph, persönliche Mitteilung). Somit ist auch die Migration von in der Leber aktivierten CD8⁺ T-Zellen in den Darm und damit eine Relevanz für eine Pathogenese im Darm denkbar.

Die Analyse spezifischer DNA-Methylierungen und Histon-Modifikationen und die daraus resultierende distinkte epigenetische Modifikation der Loci, welche in die Regulation der Expression der *Homing*rezeptoren $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 involviert sind, könnte einen ersten Ansatzpunkt zur Aufklärung der Unterschiede in der hier gezeigten Stabilität der Expression beider *Homing*rezeptoren bieten. Dahingehend wurde die Regulation der stabilen Expression von CCR6 durch epigenetische Modifikationen des *CCR6* Locus beschrieben (Steinfelder, et al.).

Die endotheliale Chemokinbereitstellung variiert zwischen verschiedenen Endothelien und hängt vom Profil der exprimierten GAG, den Bindungsaffinitäten und den Transferraten der Chemokine ab (Mordelet, et al., 2007; Witt and Lander, 1994). Ein Einfluss anderer, weniger stark in der Leber exprimierter GAG, z.B. Dermatansulfat, an der Immobilisierung bestimmter Chemokine durch LSEC wäre daher denkbar. Außerdem könnte das Lebersinusendothel eine Selektivität bezüglich der transportierten Chemokine in Abhängigkeit von der Art der Chemokine und den

vorliegenden Bedingungen zeigen. Auch sollte weiterführend untersucht werden, inwieweit der transendotheliale Transport von Chemokinen und die endotheliale Chemokinexpression unter inflammatorischen Bedingungen letztendlich an der Bereitstellung von Chemokinen durch das Lebersinusendothel beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass große Mengen an perivaskulären Chemokinen die endotheliale Expression der gleichen Chemokine über einen negativen *Feedback*-Mechanismus inhibieren (Ge, et al., 2008).

Die Frage nach der Funktion von Chemokinrezeptoren in der Chemokinbereitstellung durch das Lebersinusendothel wurde noch nicht hinreichend beantwortet. Ob CXCR4 nur an der Aufnahme von CXCL12 in LSEC beteiligt ist, oder ob an CXCR4 gebundenes CXCL12 zusammen mit dem Rezeptor transzellulär transportiert wird, ist nicht bekannt. Es wäre ebenfalls wichtig zu wissen, ob die Transzytose nur mittels *Clathrin-coated* Vesikel oder über weitere intrazelluläre vesikuläre Kompartimente erfolgt. Auch entzündungsinduzierte Änderungen in der Expression von Chemokinrezeptoren durch LSEC sollten näher betrachtet werden. Es wäre möglich, dass Endothelien Chemokinrezeptoren wie CXCR4, die homöostatische Chemokine als Liganden haben, konstitutiv exprimieren, während Chemokinrezeptoren, die inflammatorische Chemokine binden, erst unter entzündlichen Bedingungen exprimiert werden und dann möglicherweise eine Rolle bei der endothelialen Transzytose dieser Chemokine spielen. Des Weiteren sollte der Frage, ob Interzeptoren eine Rolle bei der Bereitstellung von inflammatorischen Chemokinen durch das Lebersinusendothel spielen, nachgegangen werden.

In dieser Arbeit wurden erste Belege dahingehend erbracht, dass Interventionen in die Chemokinbereitstellung durch das Lebersinusendothel unter entzündlichen Bedingungen anti-inflammatorisch wirken. Eine Selektivität dieser Wirkungen kann in

anderen T-Zell-vermittelten Hepatitis- und Cholangitismodellen verifiziert werden. Auch die Verwendung von Krankheitsmodellen anderer Organe als der Leber würden weiteren Aufschluss über den Einfluss der endothelialen Chemokinbereitstellung bei der Rekrutierung von T-Zellen und deren mögliche Beeinflussung geben. Der bisher verwendete Clathrin-Inhibitor CPZ kann als Neuroleptikum hier nur eine Modellschubstanz sein. CPZ-Derivate mit höherer Selektivität und Spezifität in ihrer Wirkweise wären wünschenswert. Weiterführende Untersuchungen bezüglich der molekularen Mechanismen, welche in die Transzytose und Immobilisierung von Chemokinen durch Endothelien involviert sind, könnten neue Ziele inhibitorisch wirkender Substanzen identifizieren, die möglicherweise eine höhere Selektivität einer anti-inflammatorischen Behandlung gewährleisten.

Literatur

Adams, D. H., and Eksteen, B. (2006): Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease, *Nat Rev Immunol* 6, [3], pp. 244-251.

Agace, W. W. (2006): Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities, *Nat Rev Immunol* 6, [9], pp. 682-692.

Ali, S., Palmer, A. C., Fritchley, S. J., Maley, Y., and Kirby, J. A. (2001): Multimerization of monocyte chemoattractant protein-1 is not required for glycosaminoglycan-dependent transendothelial chemotaxis, *Biochem J* 358, [Pt 3], pp. 737-745.

Allen, S. J., Crown, S. E., and Handel, T. M. (2007): Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism, *Annu Rev Immunol* 25, pp. 787-820.

Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J. C. (2006): Cytotoxic T cells, *J Invest Dermatol* 126, [1], pp. 32-41.

Arai, K., Liu, Z. X., Lane, T., and Dennert, G. (2002): IP-10 and Mig facilitate accumulation of T cells in the virus-infected liver, *Cell Immunol* 219, [1], pp. 48-56.

Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Lohning, M., Brauer, R., Herz, U., Renz, H., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A., and Hamann, A. (1997): P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues, *Nature* 385, [6611], pp. 81-83.

Baekkevold, E. S., Yamanaka, T., Palframan, R. T., Carlsen, H. S., Reinholt, F. P., von Andrian, U. H., Brandtzaeg, P., and Haraldsen, G. (2001): The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment, *J Exp Med* 193, [9], pp. 1105-1112.

Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (1998): Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements, *Immunol Cell Biol* 76, [1], pp. 34-40.

Bendelac, A., Savage, P. B., and Teyton, L. (2007): The biology of NKT cells, *Annu Rev Immunol* 25, pp. 297-336.

Bertolino, P., Bowen, D. G., McCaughan, G. W., and Fazekas de St Groth, B. (2001): Antigen-specific primary activation of CD8⁺ T cells within the liver, *J Immunol* 166, [9], pp. 5430-5438.

Bertolino, P., Heath, W. R., Hardy, C. L., Morahan, G., and Miller, J. F. (1995): Peripheral deletion of autoreactive CD8⁺ T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver, *Eur J Immunol* 25, [7], pp. 1932-1942.

Bertolino, P., Schrage, A., Bowen, D. G., Klugewitz, K., Ghani, S., Eulenburg, K., Holz, L., Hogg, N., McCaughan, G. W., and Hamann, A. (2005): Early intrahepatic antigen-

specific retention of naive CD8⁺ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice, *Hepatology* 42, [5], pp. 1063-1071.

Blomhoff, R., and Wake, K. (1991): Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis, *Faseb J* 5, [3], pp. 271-277.

Blouin, A., Bolender, R. P., and Weibel, E. R. (1977): Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study, *J Cell Biol* 72, [2], pp. 441-455.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998): Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s, *J Exp Med* 187, [1], pp. 129-134.

Boyd, A. W., Wawryk, S. O., Burns, G. F., and Fecondo, J. V. (1988): Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) has a central role in cell-cell contact-mediated immune mechanisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, [9], pp. 3095-3099.

Brigl, M., and Brenner, M. B. (2004): CD1: antigen presentation and T cell function, *Annu Rev Immunol* 22, pp. 817-890.

Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., and Briskin, M. (1999): Lymphocyte trafficking and regional immunity, *Adv Immunol* 72, pp. 209-253.

Cahill, R. N., Poskitt, D. C., Frost, D. C., and Trnka, Z. (1977): Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes, *J Exp Med* 145, [2], pp. 420-428.

Callery, M. P., Kamei, T., and Flye, M. W. (1989): The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding, *J Surg Res* 46, [4], pp. 391-394.

Calne, R. Y. (2000): Immunological tolerance--the liver effect, *Immunol Rev* 174, pp. 280-282.

Calne, R. Y., Sells, R. A., Pena, J. R., Davis, D. R., Millard, P. R., Herbertson, B. M., Binns, R. M., and Davies, D. A. (1969): Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts, *Nature* 223, [5205], pp. 472-476.

Campbell, D. J., and Butcher, E. C. (2002): Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues, *J Exp Med* 195, [1], pp. 135-141.

Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D. P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., Wu, L., and Butcher, E. C. (1999): The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells, *Nature* 400, [6746], pp. 776-780.

Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., and Butcher, E. C. (1998): Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions, *Science* 279, [5349], pp. 381-384.

Chan, J. R., Hyduk, S. J., and Cybulsky, M. I. (2001): Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration, *J Exp Med* 193, [10], pp. 1149-1158.

Chan, P. Y., and Aruffo, A. (1993): VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin, *J Biol Chem* 268, [33], pp. 24655-24664.

Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascurain, R. (2009): Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes, *Cell Mol Immunol* 6, [1], pp. 15-25.

Chensue, S. W. (2001): Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions, *Clin Microbiol Rev* 14, [4], pp. 821-835, table of contents.

Choi, J., Enis, D. R., Koh, K. P., Shiao, S. L., and Pober, J. S. (2004): T lymphocyte-endothelial cell interactions, *Annu Rev Immunol* 22, pp. 683-709.

Choo, J. K., Seebach, J. D., Nickeleit, V., Shimizu, A., Lei, H., Sachs, D. H., and Madsen, J. C. (1997): Species differences in the expression of major histocompatibility complex class II antigens on coronary artery endothelium: implications for cell-mediated xenoreactivity, *Transplantation* 64, [9], pp. 1315-1322.

Clegg, R. M. (1995): Fluorescence resonance energy transfer, *Curr Opin Biotechnol* 6, [1], pp. 103-110.

Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C., and Laudanna, C. (2000): Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow, *Immunity* 13, [6], pp. 759-769.

Cunningham, C. C., and Van Horn, C. G. (2003): Energy availability and alcohol-related liver pathology, *Alcohol Res Health* 27, [4], pp. 291-299.

Czaja, A. J. (1995): Autoimmune hepatitis. Evolving concepts and treatment strategies, *Dig Dis Sci* 40, [2], pp. 435-456.

da Costa Martins, P., Garcia-Vallejo, J. J., van Thienen, J. V., Fernandez-Borja, M., van Gils, J. M., Beckers, C., Horrevoets, A. J., Hordijk, P. L., and Zwaginga, J. J. (2007): P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, [5], pp. 1023-1029.

Damle, N. K., and Aruffo, A. (1991): Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+T lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, [15], pp. 6403-6407.

Damle, N. K., Klussman, K., Dietsch, M. T., Mohagheghpour, N., and Aruffo, A. (1992): GMP-140 (P-selectin/CD62) binds to chronically stimulated but not resting CD4+ T lymphocytes and regulates their production of proinflammatory cytokines, *Eur J Immunol* 22, [7], pp. 1789-1793.

Dar, A., Goichberg, P., Shinder, V., Kalinkovich, A., Kollet, O., Netzer, N., Margalit, R., Zsak, M., Nagler, A., Hardan, I., Resnick, I., Rot, A., and Lapidot, T. (2005): Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells, *Nat Immunol* 6, [10], pp. 1038-1046.

de Waal, R. M., Bogman, M. J., Maass, C. N., Cornelissen, L. M., Tax, W. J., and Koene, R. A. (1983): Variable expression of Ia antigens on the vascular endothelium of mouse skin allografts, *Nature* 303, [5916], pp. 426-429.

den Haan, J. M., Lehar, S. M., and Bevan, M. J. (2000): CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo, *J Exp Med* 192, [12], pp. 1685-1696.

Derkow, K., Loddenkemper, C., Mintern, J., Kruse, N., Klugewitz, K., Berg, T., Wiedenmann, B., Ploegh, H. L., and Schott, E. (2007): Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis, *Hepatology* 46, [4], pp. 1155-1165.

Diamantis, I., and Boumpas, D. T. (2004): Autoimmune hepatitis: evolving concepts, *Autoimmun Rev* 3, [3], pp. 207-214.

Doherty, D. G., and O'Farrelly, C. (2000): Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver, *Immunol Rev* 174, pp. 5-20.

Donzella, G. A., Schols, D., Lin, S. W., Este, J. A., Nagashima, K. A., Maddon, P. J., Allaway, G. P., Sakmar, T. P., Henson, G., De Clercq, E., and Moore, J. P. (1998): AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor, *Nat Med* 4, [1], pp. 72-77.

Dudda, J. C., Lembo, A., Bachtanian, E., Huehn, J., Siewert, C., Hamann, A., Kremmer, E., Forster, R., and Martin, S. F. (2005): Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments, *Eur J Immunol* 35, [4], pp. 1056-1065.

Duester, G. (2000): Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid, *Eur J Biochem* 267, [14], pp. 4315-4324.

Dustin, M. L., Bromley, S. K., Kan, Z., Peterson, D. A., and Unanue, E. R. (1997): Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, [8], pp. 3909-3913.

Dustin, M. L., and Springer, T. A. (1988): Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells, *J Cell Biol* 107, [1], pp. 321-331.

Dustin, M. L., and Springer, T. A. (1989): T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1, *Nature* 341, [6243], pp. 619-624.

Dzenko, K. A., Andjelkovic, A. V., Kuziel, W. A., and Pachter, J. S. (2001): The chemokine receptor CCR2 mediates the binding and internalization of monocyte chemoattractant protein-1 along brain microvessels, *J Neurosci* 21, [23], pp. 9214-9223.

Eksteen, B., Grant, A. J., Miles, A., Curbishley, S. M., Lalor, P. F., Hubscher, S. G., Briskin, M., Salmon, M., and Adams, D. H. (2004): Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9+ gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis, *J Exp Med* 200, [11], pp. 1511-1517.

Eksteen, B., Mora, J. R., Haughton, E. L., Henderson, N. C., Lee-Turner, L., Villablanca, E. J., Curbishley, S. M., Aspinall, A. I., von Andrian, U. H., and Adams, D. H. (2009): Gut homing receptors on CD8 T cells are retinoic acid dependent and not maintained by liver dendritic or stellate cells, *Gastroenterology* 137, [1], pp. 320-329.

Ferber, I., Schonrich, G., Schenkel, J., Mellor, A. L., Hammerling, G. J., and Arnold, B. (1994): Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen, *Science* 263, [5147], pp. 674-676.

Fraser, R., Dobbs, B. R., and Rogers, G. W. (1995): Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis, *Hepatology* 21, [3], pp. 863-874.

Friedman, S. L. (1996): Hepatic stellate cells, *Prog Liver Dis* 14, pp. 101-130.

Furie, M. B., and Randolph, G. J. (1995): Chemokines and tissue injury, *Am J Pathol* 146, [6], pp. 1287-1301.

Gantner, F., Leist, M., Lohse, A. W., Germann, P. G., and Tiegs, G. (1995): Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor, *Hepatology* 21, [1], pp. 190-198.

Ge, S., Song, L., Serwanski, D. R., Kuziel, W. A., and Pachter, J. S. (2008): Transcellular transport of CCL2 across brain microvascular endothelial cells, *J Neurochem* 104, [5], pp. 1219-1232.

Gerard, C., and Rollins, B. J. (2001): Chemokines and disease, *Nat Immunol* 2, [2], pp. 108-115.

- Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Res* 6, [10], pp. 995-1001.
- Gilat, D., HersHKoviz, R., Mekori, Y. A., Vlodavsky, I., and Lider, O. (1994): Regulation of adhesion of CD4⁺ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta, *J Immunol* 153, [11], pp. 4899-4906.
- Girvin, A. M., Gordon, K. B., Welsh, C. J., Clipstone, N. A., and Miller, S. D. (2002): Differential abilities of central nervous system resident endothelial cells and astrocytes to serve as inducible antigen-presenting cells, *Blood* 99, [10], pp. 3692-3701.
- Glass, W. G., Hickey, M. J., Hardison, J. L., Liu, M. T., Manning, J. E., and Lane, T. E. (2004): Antibody targeting of the CC chemokine ligand 5 results in diminished leukocyte infiltration into the central nervous system and reduced neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis, *J Immunol* 172, [7], pp. 4018-4025.
- Gordon, S. (2002): Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response, *Cell* 111, [7], pp. 927-930.
- Gowans, J. L. (1966): Life-span, recirculation, and transformation of lymphocytes, *Int Rev Exp Pathol* 5, pp. 1-24.
- Gowans, J. L., and Knight, E. J. (1964): The Route of Re-Circulation of Lymphocytes in the Rat, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159, pp. 257-282.
- Grant, A. J., Lalor, P. F., Hubscher, S. G., Briskin, M., and Adams, D. H. (2001): MAdCAM-1 expressed in chronic inflammatory liver disease supports mucosal lymphocyte adhesion to hepatic endothelium (MAdCAM-1 in chronic inflammatory liver disease), *Hepatology* 33, [5], pp. 1065-1072.
- Grant, A. J., Lalor, P. F., Salmi, M., Jalkanen, S., and Adams, D. H. (2002): Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease, *Lancet* 359, [9301], pp. 150-157.
- Gressner, A. M., Pazen, H., and Greiling, H. (1977): The biosynthesis of glycosaminoglycans in normal rat liver and in response to experimental hepatic injury, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 358, [7], pp. 825-833.
- Grusby, M. J., Johnson, R. S., Papaioannou, V. E., and Glimcher, L. H. (1991): Depletion of CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice, *Science* 253, [5026], pp. 1417-1420.
- Hadley, T. J., Lu, Z. H., Wasniowska, K., Martin, A. W., Peiper, S. C., Hesselgesser, J., and Horuk, R. (1994): Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen, *J Clin Invest* 94, [3], pp. 985-991.

Hamann, A., Andrew, D. P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B., and Butcher, E. C. (1994): Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo, *J Immunol* 152, [7], pp. 3282-3293.

Hamann, A., Klugewitz, K., Austrup, F., and Jablonski-Westrich, D. (2000): Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells, *Eur J Immunol* 30, [11], pp. 3207-3218.

Hammerschmidt, S. I., Ahrendt, M., Bode, U., Wahl, B., Kremmer, E., Forster, R., and Pabst, O. (2008): Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo, *J Exp Med* 205, [11], pp. 2483-2490.

Hancock, W. W., Lu, B., Gao, W., Csizmadia, V., Faia, K., King, J. A., Smiley, S. T., Ling, M., Gerard, N. P., and Gerard, C. (2000): Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection, *J Exp Med* 192, [10], pp. 1515-1520.

Haraldsen, G., Kvale, D., Lien, B., Farstad, I. N., and Brandtzaeg, P. (1996): Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells, *J Immunol* 156, [7], pp. 2558-2565.

Harvey, C. E., Post, J. J., Palladinetti, P., Freeman, A. J., Ffrench, R. A., Kumar, R. K., Marinos, G., and Lloyd, A. R. (2003): Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation, *J Leukoc Biol* 74, [3], pp. 360-369.

Hayry, P., von Willebrand, E., and Andersson, L. C. (1980): Expression of HLA-ABC and -DR locus antigens on human kidney, endothelial, tubular and glomerular cells, *Scand J Immunol* 11, [3], pp. 303-310.

Henninger, D. D., Panes, J., Eppihimer, M., Russell, J., Gerritsen, M., Anderson, D. C., and Granger, D. N. (1997): Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse, *J Immunol* 158, [4], pp. 1825-1832.

Heydtmann, M., Lalor, P. F., Eksteen, J. A., Hubscher, S. G., Briskin, M., and Adams, D. H. (2005): CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver, *J Immunol* 174, [2], pp. 1055-1062.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology (N Y)* 11, [9], pp. 1026-1030.

Hoebe, K., Janssen, E., and Beutler, B. (2004): The interface between innate and adaptive immunity, *Nat Immunol* 5, [10], pp. 971-974.

Homey, B., Alenius, H., Muller, A., Soto, H., Bowman, E. P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A. I., Assmann, T., Bunemann, E., Lehto, M., Wolff, H., Yen, D., Marxhausen, H., To, W., Sedgwick, J., Ruzicka, T., Lehmann, P., and Zlotnik, A.

(2002): CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation, *Nat Med* 8, [2], pp. 157-165.

Hoogewerf, A. J., Kuschert, G. S., Proudfoot, A. E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C. A., and Wells, T. N. (1997): Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines, *Biochemistry* 36, [44], pp. 13570-13578.

Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R., and Crispe, I. N. (1994): The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo, *Immunity* 1, [9], pp. 741-749.

Ikeda, K., Hirano, M., Orita, A., and Takeuchi, M. (1997): Chlorpromazine inhibits concanavalin A-induced liver injury independently of cytokine modulation, *Immunol Lett* 55, [3], pp. 127-131.

Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S. Y. (2004): Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells, *Immunity* 21, [4], pp. 527-538.

Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Forster, R., and Agace, W. W. (2005): Functional specialization of gut CD103⁺ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing, *J Exp Med* 202, [8], pp. 1063-1073.

John, B., and Crispe, I. N. (2004): Passive and active mechanisms trap activated CD8⁺ T cells in the liver, *J Immunol* 172, [9], pp. 5222-5229.

Johnson, Z., Schwarz, M., Power, C. A., Wells, T. N., and Proudfoot, A. E. (2005): Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system, *Trends Immunol* 26, [5], pp. 268-274.

Kamada, N., Davies, H. S., and Roser, B. (1981): Reversal of transplantation immunity by liver grafting, *Nature* 292, [5826], pp. 840-842.

Kempka, G., and Kolb-Bachofen, V. (1988): Binding, uptake, and transcytosis of ligands for mannose-specific receptors in rat liver: an electron microscopic study, *Exp Cell Res* 176, [1], pp. 38-48.

Khan, I. A., MacLean, J. A., Lee, F. S., Casciotti, L., DeHaan, E., Schwartzman, J. D., and Luster, A. D. (2000): IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection, *Immunity* 12, [5], pp. 483-494.

Khanna, A., Morelli, A. E., Zhong, C., Takayama, T., Lu, L., and Thomson, A. W. (2000): Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo, *J Immunol* 164, [3], pp. 1346-1354.

Klugewitz, K., Adams, D. H., Emoto, M., Eulenburg, K., and Hamann, A. (2004): The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment?, *Trends Immunol* 25, [11], pp. 590-594.

Klugewitz, K., Blumenthal-Barby, F., Schrage, A., Knolle, P. A., Hamann, A., and Crispe, I. N. (2002a): Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4⁺

effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization, *J Immunol* 169, [5], pp. 2407-2413.

Klugewitz, K., Topp, S. A., Dahmen, U., Kaiser, T., Sommer, S., Kury, E., and Hamann, A. (2002b): Differentiation-dependent and subset-specific recruitment of T-helper cells into murine liver, *Hepatology* 35, [3], pp. 568-578.

Knolle, P. A., and Gerken, G. (2000): Local control of the immune response in the liver, *Immunol Rev* 174, pp. 21-34.

Knolle, P. A., and Limmer, A. (2003): Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells, *Swiss Med Wkly* 133, [37-38], pp. 501-506.

Knolle, P. A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., Gerken, G., and Lohse, A. W. (1999): Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells, *Gastroenterology* 116, [6], pp. 1428-1440.

Knolle, P. A., Uhrig, A., Hegenbarth, S., Loser, E., Schmitt, E., Gerken, G., and Lohse, A. W. (1998): IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules, *Clin Exp Immunol* 114, [3], pp. 427-433.

Kollet, O., Shivtiel, S., Chen, Y. Q., Suriawinata, J., Thung, S. N., Dabeva, M. D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., Goichberg, P., Kalinkovich, A., Arenzana-Seisdedos, F., Nagler, A., Hardan, I., Revel, M., Shafritz, D. A., and Lapidot, T. (2003): HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver, *J Clin Invest* 112, [2], pp. 160-169.

Kruse, N., Neumann, K., Schrage, A., Derkow, K., Schott, E., Erben, U., Kuhl, A., Loddenkemper, C., Zeitz, M., Hamann, A., and Klugewitz, K. (2009): Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3-regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis, *Hepatology* 50, [6], pp. 1904-1913.

Kunkel, E. J., Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Vierra, M. A., Goodman, S. B., Genovese, M. C., Wardlaw, A. J., Greenberg, H. B., Parker, C. M., Butcher, E. C., Andrew, D. P., and Agace, W. W. (2000): Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity, *J Exp Med* 192, [5], pp. 761-768.

Kurose, I., Anderson, D. C., Miyasaka, M., Tamatani, T., Paulson, J. C., Todd, R. F., Rusche, J. R., and Granger, D. N. (1994): Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage, *Circ Res* 74, [2], pp. 336-343.

- Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F., and Kosaka, H. (1996): Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo, *J Exp Med* 184, [3], pp. 923-930.
- Kuschert, G. S., Coulin, F., Power, C. A., Proudfoot, A. E., Hubbard, R. E., Hoogewerf, A. J., and Wells, T. N. (1999): Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses, *Biochemistry* 38, [39], pp. 12959-12968.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, [5259], pp. 680-685.
- Lalor, P. F., and Adams, D. H. (2002): The liver: a model of organ-specific lymphocyte recruitment, *Expert Rev Mol Med* 4, [2], pp. 1-16.
- Lalor, P. F., Edwards, S., McNab, G., Salmi, M., Jalkanen, S., and Adams, D. H. (2002): Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells, *J Immunol* 169, [2], pp. 983-992.
- Lau, A. H., and Thomson, A. W. (2003): Dendritic cells and immune regulation in the liver, *Gut* 52, [2], pp. 307-314.
- Lawrence, M. B., and Springer, T. A. (1991): Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins, *Cell* 65, [5], pp. 859-873.
- Leifeld, L., Dumoulin, F. L., Purr, I., Janberg, K., Trautwein, C., Wolff, M., Manns, M. P., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (2003): Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure, *J Pathol* 199, [3], pp. 335-344.
- Ley, K., Gaehtgens, P., Fennie, C., Singer, M. S., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1991): Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo, *Blood* 77, [12], pp. 2553-2555.
- Ley, K., and Kansas, G. S. (2004): Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation, *Nat Rev Immunol* 4, [5], pp. 325-335.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nat Rev Immunol* 7, [9], pp. 678-689.
- Liao, F., Ali, J., Greene, T., and Muller, W. A. (1997): Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo, *J Exp Med* 185, [7], pp. 1349-1357.
- Lim, Y. C., Henault, L., Wagers, A. J., Kansas, G. S., Luscinskas, F. W., and Lichtman, A. H. (1999): Expression of functional selectin ligands on Th cells is differentially regulated by IL-12 and IL-4, *J Immunol* 162, [6], pp. 3193-3201.

Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H. G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P. A. (2000): Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance, *Nat Med* 6, [12], pp. 1348-1354.

Limmer, A., Ohl, J., Wingender, G., Berg, M., Jungerkes, F., Schumak, B., Djandji, D., Scholz, K., Klevenz, A., Hegenbarth, S., Momburg, F., Hammerling, G. J., Arnold, B., and Knolle, P. A. (2005): Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance, *Eur J Immunol* 35, [10], pp. 2970-2981.

Lis, H., and Sharon, N. (1986): Lectins as molecules and as tools, *Annu Rev Biochem* 55, pp. 35-67.

Loetscher, P., Moser, B., and Baggiolini, M. (2000): Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection, *Adv Immunol* 74, pp. 127-180.

Lohse, A. W., Knolle, P. A., Bilo, K., Uhrig, A., Waldmann, C., Ibe, M., Schmitt, E., Gerken, G., and Meyer Zum Buschenfelde, K. H. (1996): Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells, *Gastroenterology* 110, [4], pp. 1175-1181.

Luscinskas, F. W., Ding, H., and Lichtman, A. H. (1995): P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4⁺ T lymphocytes on tumor necrosis factor alpha-activated vascular endothelium under flow, *J Exp Med* 181, [3], pp. 1179-1186.

Luth, S., Huber, S., Schramm, C., Buch, T., Zander, S., Stadelmann, C., Bruck, W., Wraith, D. C., Herkel, J., and Lohse, A. W. (2008): Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs, *J Clin Invest* 118, [10], pp. 3403-3410.

Lyons, A. B., and Parish, C. R. (1994): Determination of lymphocyte division by flow cytometry, *J Immunol Methods* 171, [1], pp. 131-137.

Mackay, C. R. (1991): T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways, *Immunol Today* 12, [6], pp. 189-192.

MacPhee, P. J., Schmidt, E. E., and Groom, A. C. (1995): Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy, *Am J Physiol* 269, [5 Pt 1], pp. G692-698.

Maher, J. J., Lozier, J. S., and Scott, M. K. (1998): Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant in culture and in vivo, *Am J Physiol* 275, [4 Pt 1], pp. G847-853.

Mantovani, A. (1999): The chemokine system: redundancy for robust outputs, *Immunol Today* 20, [6], pp. 254-257.

- Marelli-Berg, F. M., Frasca, L., Weng, L., Lombardi, G., and Lechler, R. I. (1999): Antigen recognition influences transendothelial migration of CD4⁺ T cells, *J Immunol* 162, [2], pp. 696-703.
- Marelli-Berg, F. M., James, M. J., Dangerfield, J., Dyson, J., Millrain, M., Scott, D., Simpson, E., Nourshargh, S., and Lechler, R. I. (2004): Cognate recognition of the endothelium induces HY-specific CD8⁺ T-lymphocyte transendothelial migration (diapedesis) in vivo, *Blood* 103, [8], pp. 3111-3116.
- Marra, F., DeFranco, R., Grappone, C., Milani, S., Pastacaldi, S., Pinzani, M., Romanelli, R. G., Laffi, G., and Gentilini, P. (1998): Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration, *Am J Pathol* 152, [2], pp. 423-430.
- Mayadas, T. N., Johnson, R. C., Rayburn, H., Hynes, R. O., and Wagner, D. D. (1993): Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice, *Cell* 74, [3], pp. 541-554.
- McEver, R. P., and Cummings, R. D. (1997): Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment, *J Clin Invest* 100, [11 Suppl], pp. S97-103.
- McNab, G., Reeves, J. L., Salmi, M., Hubscher, S., Jalkanen, S., and Adams, D. H. (1996): Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium, *Gastroenterology* 110, [2], pp. 522-528.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000): Innate immune recognition: mechanisms and pathways, *Immunol Rev* 173, pp. 89-97.
- Mehal, W. Z., Juedes, A. E., and Crispe, I. N. (1999): Selective retention of activated CD8⁺ T cells by the normal liver, *J Immunol* 163, [6], pp. 3202-3210.
- Mellman, I. (1996): Endocytosis and molecular sorting, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, pp. 575-625.
- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., and Rot, A. (1997): Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells, *Cell* 91, [3], pp. 385-395.
- Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C., and Ashton, B. A. (2002): Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium, *Blood* 100, [12], pp. 3853-3860.
- Millan, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., and Ridley, A. J. (2006): Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains, *Nat Cell Biol* 8, [2], pp. 113-123.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS, *Cytometry* 11, [2], pp. 231-238.

- Mora, J. R., Bono, M. R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L. L., Roseblatt, M., and Von Andrian, U. H. (2003): Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells, *Nature* 424, [6944], pp. 88-93.
- Mora, J. R., Cheng, G., Picarella, D., Briskin, M., Buchanan, N., and von Andrian, U. H. (2005): Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues, *J Exp Med* 201, [2], pp. 303-316.
- Mora, J. R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S. Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K. L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., Rajewsky, K., Adams, D. H., and von Andrian, U. H. (2006): Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells, *Science* 314, [5802], pp. 1157-1160.
- Morales, J., Homey, B., Vicari, A. P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., McEvoy, L. M., and Zlotnik, A. (1999): CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, [25], pp. 14470-14475.
- Mordelet, E., Davies, H. A., Hillyer, P., Romero, I. A., and Male, D. (2007): Chemokine transport across human vascular endothelial cells, *Endothelium* 14, [1], pp. 7-15.
- Moser, B., and Willimann, K. (2004): Chemokines: role in inflammation and immune surveillance, *Ann Rheum Dis* 63 Suppl 2, pp. ii84-ii89.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004): Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control, *Trends Immunol* 25, [2], pp. 75-84.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Annu Rev Immunol* 7, pp. 145-173.
- Mostov, K. E. (1994): Transepithelial transport of immunoglobulins, *Annu Rev Immunol* 12, pp. 63-84.
- Murdoch, C., Monk, P. N., and Finn, A. (1999): Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells, *Cytokine* 11, [9], pp. 704-712.
- Murphy, K. M., Heimberger, A. B., and Loh, D. Y. (1990): Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes in vivo, *Science* 250, [4988], pp. 1720-1723.
- Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y., and Yamamoto, T. (2004): Differentiation and function of Kupffer cells, *Med Electron Microsc* 37, [1], pp. 16-28.
- Nakache, M., Berg, E. L., Streeter, P. R., and Butcher, E. C. (1989): The mucosal vascular addressin is a tissue-specific endothelial cell adhesion molecule for circulating lymphocytes, *Nature* 337, [6203], pp. 179-181.

- Nakatani, K., Kaneda, K., Seki, S., and Nakajima, Y. (2004): Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function, *Med Electron Microsc* 37, [1], pp. 29-36.
- Ostermann, G., Weber, K. S., Zerneck, A., Schroder, A., and Weber, C. (2002): JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes, *Nat Immunol* 3, [2], pp. 151-158.
- Papadakis, K. A., Prehn, J., Nelson, V., Cheng, L., Binder, S. W., Ponath, P. D., Andrew, D. P., and Targan, S. R. (2000): The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system, *J Immunol* 165, [9], pp. 5069-5076.
- Parker, G. A., and Picut, C. A. (2005): Liver immunobiology, *Toxicol Pathol* 33, [1], pp. 52-62.
- Patel, D. D., Koopmann, W., Imai, T., Whichard, L. P., Yoshie, O., and Krangel, M. S. (2001): Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients, *Clin Immunol* 99, [1], pp. 43-52.
- Patel, K. D., Cuvelier, S. L., and Wiehler, S. (2002): Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment, *Semin Immunol* 14, [2], pp. 73-81.
- Pickar, L. J., Kishimoto, T. K., Smith, C. W., Warnock, R. A., and Butcher, E. C. (1991): ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells, *Nature* 349, [6312], pp. 796-799.
- Pober, J. S. (1999): Immunobiology of human vascular endothelium, *Immunol Res* 19, [2-3], pp. 225-232.
- Pober, J. S., Kluger, M. S., and Schechner, J. S. (2001): Human endothelial cell presentation of antigen and the homing of memory/effector T cells to skin, *Ann N Y Acad Sci* 941, pp. 12-25.
- Prickett, T. C., McKenzie, J. L., and Hart, D. N. (1988): Characterization of interstitial dendritic cells in human liver, *Transplantation* 46, [5], pp. 754-761.
- Proudfoot, A. E. (2002): Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets, *Nat Rev Immunol* 2, [2], pp. 106-115.
- Pruenster, M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., Richmond, A., Graham, G. J., Segerer, S., Nibbs, R. J., and Rot, A. (2009): The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity, *Nat Immunol* 10, [1], pp. 101-108.
- Rasmussen, A., Davies, H. F., Jamieson, N. V., Evans, D. B., and Calne, R. Y. (1995): Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival, *Transplantation* 59, [6], pp. 919-921.

- Reinhardt, R. L., Bullard, D. C., Weaver, C. T., and Jenkins, M. K. (2003): Preferential accumulation of antigen-specific effector CD4 T cells at an antigen injection site involves CD62E-dependent migration but not local proliferation, *J Exp Med* 197, [6], pp. 751-762.
- Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2001): CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin, *J Exp Med* 194, [10], pp. 1541-1547.
- Rivera-Nieves, J., Burcin, T. L., Olson, T. S., Morris, M. A., McDuffie, M., Cominelli, F., and Ley, K. (2006): Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis, *J Exp Med* 203, [4], pp. 907-917.
- Robertson, J. M., Jensen, P. E., and Evavold, B. D. (2000): DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope, *J Immunol* 164, [9], pp. 4706-4712.
- Roman, E., Miller, E., Harmsen, A., Wiley, J., Von Andrian, U. H., Huston, G., and Swain, S. L. (2002): CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function, *J Exp Med* 196, [7], pp. 957-968.
- Rot, A. (1992): Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration, *Immunol Today* 13, [8], pp. 291-294.
- Rot, A. (2003): In situ binding assay for studying chemokine interactions with endothelial cells, *J Immunol Methods* 273, [1-2], pp. 63-71.
- Rothberg, K. G., Ying, Y. S., Kamen, B. A., and Anderson, R. G. (1990): Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate, *J Cell Biol* 111, [6 Pt 2], pp. 2931-2938.
- Rothoeft, T., Gonschorek, A., Bartz, H., Anhenn, O., and Schauer, U. (2003): Antigen dose, type of antigen-presenting cell and time of differentiation contribute to the T helper 1/T helper 2 polarization of naive T cells, *Immunology* 110, [4], pp. 430-439.
- Rubinstein, D., Roska, A. K., and Lipsky, P. E. (1986): Liver sinusoidal lining cells express class II major histocompatibility antigens but are poor stimulators of fresh allogeneic T lymphocytes, *J Immunol* 137, [6], pp. 1803-1810.
- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1998): Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes, *J Exp Med* 187, [6], pp. 875-883.
- Salmi, M., and Jalkanen, S. (1997): How do lymphocytes know where to go: current concepts and enigmas of lymphocyte homing, *Adv Immunol* 64, pp. 139-218.
- Savinov, A. Y., Wong, F. S., Stonebraker, A. C., and Chervonsky, A. V. (2003): Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8+ T cells, *J Exp Med* 197, [5], pp. 643-656.

Schaerli, P., and Moser, B. (2005): Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic, *Immunol Res* 31, [1], pp. 57-74.

Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., and Muller, W. A. (2002): CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions, *Nat Immunol* 3, [2], pp. 143-150.

Schlepper-Schafer, J., Hulsmann, D., Djovkar, A., Meyer, H. E., Herbertz, L., Kolb, H., and Kolb-Bachofen, V. (1986): Endocytosis via galactose receptors in vivo. Ligand size directs uptake by hepatocytes and/or liver macrophages, *Exp Cell Res* 165, [2], pp. 494-506.

Schols, D., Struyf, S., Van Damme, J., Este, J. A., Henson, G., and De Clercq, E. (1997): Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4, *J Exp Med* 186, [8], pp. 1383-1388.

Schrage, A., Loddenkemper, C., Erben, U., Lauer, U., Hausdorf, G., Jungblut, P. R., Johnson, J., Knolle, P. A., Zeitz, M., Hamann, A., and Klugewitz, K. (2008a): Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1, *Histochem Cell Biol* 129, [4], pp. 441-451.

Schrage, A., Wechsung, K., Neumann, K., Schumann, M., Schulzke, J. D., Engelhardt, B., Zeitz, M., Hamann, A., and Klugewitz, K. (2008b): Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines, *Hepatology* 48, [4], pp. 1262-1272.

Schraufstatter, I. U., Chung, J., and Burger, M. (2001): IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, [6], pp. L1094-1103.

Schwabe, R. F., Bataller, R., and Brenner, D. A. (2003): Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, [5], pp. G949-958.

Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguet, J. M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M. K., Staunton, D. E., von Andrian, U. H., and Alon, R. (2005): Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines, *Nat Immunol* 6, [5], pp. 497-506.

Shields, P. L., Morland, C. M., Salmon, M., Qin, S., Hubscher, S. G., and Adams, D. H. (1999): Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver, *J Immunol* 163, [11], pp. 6236-6243.

Siegmund, B., Lear-Kaul, K. C., Faggioni, R., and Fantuzzi, G. (2002): Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis, *Eur J Immunol* 32, [2], pp. 552-560.

Signoret, N., Hewlett, L., Wavre, S., Pelchen-Matthews, A., Oppermann, M., and Marsh, M. (2005): Agonist-induced endocytosis of CC chemokine receptor 5 is clathrin dependent, *Mol Biol Cell* 16, [2], pp. 902-917.

Silber, A., Newman, W., Sasseville, V. G., Pauley, D., Beall, D., Walsh, D. G., and Ringler, D. J. (1994): Recruitment of lymphocytes during cutaneous delayed hypersensitivity in nonhuman primates is dependent on E-selectin and vascular cell adhesion molecule 1, *J Clin Invest* 93, [4], pp. 1554-1563.

Sima, A., Parisotto, M., Mader, S., and Bhat, P. V. (2009): Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates, *Biochim Biophys Acta* 1790, [12], pp. 1660-1664.

Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., and Jordan, M. S. (2009): T cell activation, *Annu Rev Immunol* 27, pp. 591-619.

Song, L., and Pachter, J. S. (2004): Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells, *Microvasc Res* 67, [1], pp. 78-89.

Sprent, J. (1973): Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties, *Cell Immunol* 7, [1], pp. 10-39.

St Louis, J. D., Lederer, J. A., and Lichtman, A. H. (1993): Costimulator deficient antigen presentation by an endothelial cell line induces a nonproliferative T cell activation response without anergy, *J Exp Med* 178, [5], pp. 1597-1605.

Stagg, A. J., Kamm, M. A., and Knight, S. C. (2002): Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin, *Eur J Immunol* 32, [5], pp. 1445-1454.

Steffen, B. J., Butcher, E. C., and Engelhardt, B. (1994): Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse, *Am J Pathol* 145, [1], pp. 189-201.

Steinfelder, S., Floess, S., Engelbert, D., Haeringer, B., Baron, U., Rivino, L., Steckel, B., Gruetzkau, A., Olek, S., Geginat, J., Huehn, J., and Hamann, A. Epigenetic modification of the human CCR6 gene is associated with stable CCR6 expression in T cells, *Blood* 117, [10], pp. 2839-2846.

Steinhoff, G., Behrend, M., Schrader, B., Duijvestijn, A. M., and Wonigeit, K. (1993): Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, and LFA-3, *Am J Pathol* 142, [2], pp. 481-488.

Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., Carramolino, L., Broden, T., Marquez, G., and Agace, W. W. (2002): CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha-beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa, *J Clin Invest* 110, [8], pp. 1113-1121.

- Takeda, K., Hayakawa, Y., Van Kaer, L., Matsuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. (2000): Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, [10], pp. 5498-5503.
- Tanaka, Y., Adams, D. H., and Shaw, S. (1993): Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes, *Immunol Today* 14, [3], pp. 111-115.
- Tanaka, Y., Fujii, K., Hubscher, S., Aso, M., Takazawa, A., Saito, K., Ota, T., and Eto, S. (1998): Heparan sulfate proteoglycan on endothelium efficiently induces integrin-mediated T cell adhesion by immobilizing chemokines in patients with rheumatoid synovitis, *Arthritis Rheum* 41, [8], pp. 1365-1377.
- Teraki, Y., and Picker, L. J. (1997): Independent regulation of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression and cytokine synthesis phenotype during human CD4+ memory T cell differentiation, *J Immunol* 159, [12], pp. 6018-6029.
- Tiegs, G., Hentschel, J., and Wendel, A. (1992): A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A, *J Clin Invest* 90, [1], pp. 196-203.
- Tietz, W., Allemand, Y., Borges, E., von Laer, D., Hallmann, R., Vestweber, D., and Hamann, A. (1998): CD4+ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin, *J Immunol* 161, [2], pp. 963-970.
- Trombetta, E. S., and Mellman, I. (2005): Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo, *Annu Rev Immunol* 23, pp. 975-1028.
- Tuma, P. L., and Hubbard, A. L. (2003): Transcytosis: crossing cellular barriers, *Physiol Rev* 83, [3], pp. 871-932.
- Van Seventer, G. A., Shimizu, Y., Horgan, K. J., and Shaw, S. (1990): The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells, *J Immunol* 144, [12], pp. 4579-4586.
- Veazey, R. S., Springer, M. S., Marx, P. A., Dufour, J., Klasse, P. J., and Moore, J. P. (2005): Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by an orally delivered CCR5 inhibitor, *Nat Med* 11, [12], pp. 1293-1294.
- von Andrian, U. H., Chambers, J. D., McEvoy, L. M., Bargatze, R. F., Arfors, K. E., and Butcher, E. C. (1991): Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, [17], pp. 7538-7542.
- Wagner, N., Lohler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., Rajewsky, K., and Muller, W. (1996): Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue, *Nature* 382, [6589], pp. 366-370.
- Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P., and Esko, J. D. (2005): Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses, *Nat Immunol* 6, [9], pp. 902-910.

- Wang, L. H., Rothberg, K. G., and Anderson, R. G. (1993): Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation, *J Cell Biol* 123, [5], pp. 1107-1117.
- Ward, S. G., and Marelli-Berg, F. M. (2009): Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation, *Biochem J* 418, [1], pp. 13-27.
- Warren, A., Le Couteur, D. G., Fraser, R., Bowen, D. G., McCaughan, G. W., and Bertolino, P. (2006): T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells, *Hepatology* 44, [5], pp. 1182-1190.
- Weninger, W., Ulfman, L. H., Cheng, G., Souchkova, N., Quackenbush, E. J., Lowe, J. B., and von Andrian, U. H. (2000): Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels, *Immunity* 12, [6], pp. 665-676.
- Wiegard, C., Frenzel, C., Herkel, J., Kallen, K. J., Schmitt, E., and Lohse, A. W. (2005): Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Hepatology* 42, [1], pp. 193-199.
- Wisse, E. (1972): An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells, *J Ultrastruct Res* 38, [5], pp. 528-562.
- Wisse, E., De Zanger, R. B., Charels, K., Van Der Smissen, P., and McCuskey, R. S. (1985): The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse, *Hepatology* 5, [4], pp. 683-692.
- Witt, D. P., and Lander, A. D. (1994): Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations, *Curr Biol* 4, [5], pp. 394-400.
- Wolf, G. (2006): Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor?, *Nutr Rev* 64, [12], pp. 532-538.
- Wong, J., Johnston, B., Lee, S. S., Bullard, D. C., Smith, C. W., Beaudet, A. L., and Kubes, P. (1997): A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature, *J Clin Invest* 99, [11], pp. 2782-2790.
- Wurbel, M. A., Philippe, J. M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M. G., Malissen, M., Jordan, B. R., Malissen, B., Carrier, A., and Naquet, P. (2000): The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9, *Eur J Immunol* 30, [1], pp. 262-271.
- Yamamoto, S., Sato, Y., Shimizu, T., Halder, R. C., Oya, H., Bannai, M., Suzuki, K., Ishikawa, H., Hatakeyama, K., and Abo, T. (1999): Consistent infiltration of thymus-derived T cells into the parenchymal space of the liver in normal mice, *Hepatology* 30, [3], pp. 705-713.

Yang, W., Wang, D., and Richmond, A. (1999): Role of clathrin-mediated endocytosis in CXCR2 sequestration, resensitization, and signal transduction, *J Biol Chem* 274, [16], pp. 11328-11333.

Yokota, A., Takeuchi, H., Maeda, N., Ohoka, Y., Kato, C., Song, S. Y., and Iwata, M. (2009): GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity, *Int Immunol* 21, [4], pp. 361-377.

Yoshida, N., Granger, D. N., Evans, D. J., Jr., Evans, D. G., Graham, D. Y., Anderson, D. C., Wolf, R. E., and Kviety, P. R. (1993): Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation, *Gastroenterology* 105, [5], pp. 1431-1440.

Zabel, B. A., Agace, W. W., Campbell, J. J., Heath, H. M., Parent, D., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., LaRosa, G. J., Yang, L. L., Soler, D., Butcher, E. C., Ponath, P. D., Parker, C. M., and Andrew, D. P. (1999): Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis, *J Exp Med* 190, [9], pp. 1241-1256.

Zheng, B., Ozen, Z., Zhang, X., De Silva, S., Marinova, E., Guo, L., Wansley, D., Huston, D. P., West, M. R., and Han, S. (2005): CXCL13 neutralization reduces the severity of collagen-induced arthritis, *Arthritis Rheum* 52, [2], pp. 620-626.

Zinkernagel, R. M., Ehl, S., Aichele, P., Oehen, S., Kundig, T., and Hengartner, H. (1997): Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity, *Immunol Rev* 156, pp. 199-209.

Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. Katja Klugewitz für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas und die Betreuung während der Doktorarbeit. Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Alf Hamann für die Unterstützung und Begutachtung der Doktorarbeit von Seiten der Humboldt-Universität zu Berlin bedanken. Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Martin Zeitz für die Möglichkeit die Doktorarbeit in der Forschungsabteilung der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ulrike Erben, die mich mit großem wissenschaftlichen Fachwissen und viel Engagement während der Doktorarbeit unterstützt hat. Nils Kruse möchte ich ebenfalls ganz herzlich für den gedanklichen Austausch und die praktische Unterstützung während der Doktorarbeit danken.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Anja Kühl, Katja Grollich und Simone Spieckerman für die Durchführung der histologischen Analysen bedanken. Katja Blunert danke ich für ihre Hilfe bei der Etablierung der TaqMan®-*real-time*-PCR. Bei Katja Wechsung bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei den Transmigrationsassays. Ich danke Herrn Dr. Michael Schumann und Claudia May für die Durchführung der konfokalen Laser-*Scanning*-Mikroskopie. Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Eckart Schott und Frau PD Dr. Uta Höpken für die Überlassung der TF-OVA-Mäuse bzw. CXCR3^{-/-}-Mäuse sowie bei Balint Szilagyi für die Bereitstellung der Vitamin A-defizienten Mäuse.

Ich danke allen Mitarbeitern der Labore des Karl-Landsteiner-Hauses für die angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Anhang

Veröffentlichungen

Publikationen

Neumann K, Kruse N, Szilagyi B, Erben U, Rudolph C, Flach A, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K. (2011) Connecting liver and gut: murine liver sinusoidal endothelium induces gut tropism of CD4⁺ T cells via retinoic acid. *Hepatology*, [Epub ahead of print].

Doebis C, Menning A, Neumann K, Ghani S, Schlawe K, Lauer U, Hamann A, Huehn J, Syrbé U. (2011) Accumulation and local proliferation of antigen-specific CD4⁺ T cells in antigen-bearing tissue. *Immunol Cell Biol*, 89(4): 566-72.

Kruse N, Neumann K, Schrage A, Derkow K, Schott E, Erben U, Kühl A, Loddenkemper C, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K. (2009) Priming of CD4⁺ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3⁻ regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 50(6): 1904-13.

Schrage A, Wechsung K, Neumann K, Schumann M, Schulzke JD, Engelhardt B, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K. (2008) Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines. *Hepatology*, 48(4): 1262-72.

Stähler F, Riedel K, Demgensky S, Neumann K, Dunkel A, Täubert A, Raab B, Behrens M, Raguse JD, Hofmann T, Meyerhof M. (2008) A Role of the Epithelial Sodium Channel in Human Salt Taste Transduction? *Chemosensory Perception*, 1(1): 78-90.

Manuskripte in Vorbereitung

Neumann K, Kruse N, Wechsung K, Schumann M, Kühl A, Erben U, Zeitz M, Klugewitz K. Chemokine presentation by liver sinusoidal endothelial cells as therapeutic target in murine T cell-mediated hepatitis.

Kruse N, Neumann K, Rudolph C, Erben U, Eulenburg K, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K. Distinct roles of murine liver antigen presenting cells in T cell homeostasis and oral tolerance.

Vortrag

2nd European Congress of Immunology, Berlin, 2009. Endothelial chemokine presentation as therapeutic target in murine T cell-mediated hepatitis

Posterpräsentationen

Joint Annual Meeting of the Italian Society for Immunology and the German Society of Immunology, Riccione, 2011. Connecting liver and gut: murine liver sinusoidal endothelium induces gut tropism of CD4⁺ T cells via retinoic acid

Falk Workshop Immunology and Liver Disease, Hannover, 2009. Endothelial chemokine presentation as therapeutic target in autoimmune hepatitis.

2nd European Congress of Immunology, Berlin, 2009. Endothelial chemokine presentation as therapeutic target in autoimmune hepatitis.

44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen, 2009. Endothelial chemokine presentation as therapeutic target in autoimmune hepatitis.

EASL Monothematic Conference: Immune mediated liver injury, Hamburg, 2008. Chemokine uptake and presentation by liver sinusoidal endothelial cells regulates T-cell transmigration

Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGFI), Wien, 2008. Chemokine uptake and presentation by liver sinusoidal endothelial cells regulates T-cell transmigration into the liver

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin